

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 21 March 2000 (21.03.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/04332	<b>Applicant's or agent's file reference</b> M1-104PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 10 August 1999 (10.08.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 10 August 1998 (10.08.98)
<b>Applicant</b> MURASUGI, Akira et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 February 2000 (18.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Diana Nissen</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--



E P



P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 M1-104PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04332	国際出願日 (日.月.年) 10.08.99	優先日 (日.月.年) 10.08.98
出願人(氏名又は名称) 明治乳業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/81, C12N 1/19, C12P 21/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/81, C12N 1/19, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	菱沼 文男 “酵母による異種蛋白質の分泌生産”, 化学と生物 (1983), Vol. 26, No. 9 (298号) p. 568-618	1-9
A	JP, 2-156881, A (工業技術院長) 15. 6月. 1990 (15. 06. 90) ファミリーなし	1-9
A	JP, 2-156880, A (工業技術院長) 15. 6月. 1990 (15. 06. 90) ファミリーなし	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9 3 5 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448





C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Par Gellerforst et al. "Isolation and characterization of a glycosylated form of human insulin-like growth factor I produced in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", The Journal of Biological Chemistry (1989) , Vol. 264, No. 19 p. 11444-11449	1 - 9





# Isolation and Characterization of a Glycosylated Form of Human Insulin-like Growth Factor I Produced in *Saccharomyces cerevisiae*\*

(Received for publication, December 30, 1988)

Per Gellerfors†, Kent Axelsson, Anne Helander, Stig Johansson, Lennart Kennes, Staffan Lindqvist, Bohdan Pavlu, Anna Skottner, and Linda Fryklund

From KABI, S-112 87 Stockholm, Sweden and the ‡Department of Organic Chemistry, Arrhenius Laboratory, University of Stockholm, S-106 91 Stockholm, Sweden

Expression and secretion of human insulin-like growth factor-I (IGF-I) in *Saccharomyces cerevisiae* was achieved by linking an actin (ACT) promoter to an MF $\alpha$ 1 prepro leader peptide/IGF-I gene fusion. Purified human IGF-I from yeast culture media was found to contain, in addition to the native form, also a glycosylated variant. Structural studies showed that both IGF-I forms were processed identically, resulting in 70-amino-acid long polypeptides, with intact N-terminal and C-terminal residues of glycine and alanine, respectively. The glycosylation site was determined to threonine-29 (Thr<sup>29</sup>), by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and protein sequence analysis of an isolated tryptic peptide(22-36). No other glycosylation sites were found. Only mannose was detected in the sugar analysis, with an estimated content of 4.5% w/w corresponding to 2 mannose residues per molecule of IGF-I. The carbohydrate structure, determined by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, was found to be  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)Thr corresponding to an O-linked glycoprotein structure. No other post-translational modifications could be identified in the glycosylated IGF-I form. Furthermore, this form was highly active, comparable to native IGF-I, exhibiting a specific activity of 20,500 units/mg, as determined by a radio-receptor assay.

The secretion process in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is similar to that of higher eucaryotic cells. Consequently, it has been possible to synthesize and secrete various foreign proteins of widely different origin in yeast, as for example, human epidermal growth factor (1), human haptoglobin (2), rat NADPH-cytochrome P-450 reductase (3).

The steps in the secretion process in yeast have been studied by Schekman and co-workers (4, 5) using temperature-sensitive secretion (sec) mutants. The secretory pathway was shown to involve several membrane structures that mediate the transfer of exported proteins from the site of synthesis at the endoplasmic reticulum via the Golgi apparatus to secretory vesicles. These were suggested to fuse, by an endocytotic mechanism, with the plasma membrane liberating the secretory proteins into the media (4, 5). The study of  $\alpha$ -mating factor secretion has provided further detailed information on the secretion process in yeast (6-8).

Despite a wealth of detailed information available on the

yeast secretion process, little is known about possible post-translational modifications occurring when heterologous proteins are expressed and secreted in yeast.

In this study, IGF-I<sup>1</sup> (somatomedin C), which is a basic polypeptide of 70 amino acid residues (9), was expressed in *S. cerevisiae*. A yeast expression plasmid (10), recently improved by Ernst,<sup>2</sup> containing an MF $\alpha$ 1 leader peptide/IGF-I gene fusion, was used to synthesize and secrete human IGF-I into the medium. By using an HPLC system, it has been possible to separate a glycosylated analogue of IGF-I from native IGF-I. The glycosylated IGF-I analogue has been purified and its structure studied.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Myoglobin cyanobromide fragments were obtained from British Drug House. The methyl glycoside of  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -D-Manp, TPCK-treated trypsin, and concanavalin A-horseradish peroxidase were all purchased from Sigma. S-Sepharose, phenyl-Sepharose, Sephadex G-50, and PD-10 were all from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. Brij<sup>®</sup> 35 was from Pierce, and Bio-Gel P-2 from Bio-Rad. Carboxypeptidase A treated with diisopropyl fluorophosphate was bought from Boehringer Mannheim. All other chemicals used were of analytical grade.

**Plasmid and Yeast Strain**—Plasmid 539/12, used for the expression of IGF-I in yeast, was constructed by Dr. J. F. Ernst at Biogen, S. A., Switzerland. It is an improved version of plasmid p364/1 (10). The expression of IGF-I was carried out in the *S. cerevisiae* mutant strain YE449 (Mata leu2 ura3-52 prb1122 pep4-3 cir<sup>o</sup>).

**Isolation of Glycosylated IGF-I**—Fermentation medium was fractionated first on a phenyl-Sepharose column and then on an S-Sepharose column. Fractions exhibiting IGF-I activity, as determined by a radioimmunoassay, were pooled and further fractionated on a Sephadex G-50 column.

The active fractions were further chromatographed on a TSK phenyl 5 PW column (75  $\times$  7.5 mm inside diameter; Tosoh Corp., Japan). The column was equilibrated in a buffer containing 30 mM Tris-HCl and 0.7 M sodium sulfate at pH 8.0. Elution was accomplished by a linear gradient for 60 min with a flow rate of 1 ml/min using a buffer containing 30 mM Tris-HCl, 5% acetonitrile, and 0.075% Brij 35<sup>®</sup> at pH 8.0. The eluate was monitored by UV detection at 280 nm.

**Tryptic Digestion**—Samples (0.5 mg/ml) of IGF-I and the analogue were dissolved in aqueous 1% ammonium bicarbonate. Digestion was performed by TPCK-treated trypsin at an enzyme to substrate ratio

<sup>1</sup> The abbreviations used are: IGF, insulin-like growth factor; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; ConA, concanavalin A; Manp, mannopyranose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; TCPK, L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone; MF $\alpha$ 1,  $\alpha$ -mating factor gene; HPLC, hydrophobic interaction high performance liquid chromatography; Brij 35<sup>®</sup>, polyoxyethylene 23 lauryl ether; PTH, phenylthiohydantoin; COSY, homonuclear chemical shift correlation spectroscopy; NOESY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy; ROESY, rotating-frame Overhauser enhancement spectroscopy; HMQC, heteronuclear multiple quantum coherence.

<sup>2</sup> J. F. Ernst, unpublished observations.

\* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence and reprint requests should be addressed.



of 1:30 at 37 °C for 2 h. The reaction mixture was subsequently incubated for 20 min in the presence of dithioerythritol at a dithioerythritol to protein ratio of 2.5:1. Finally, trifluoroacetic acid was added to 1% (final concentration), and the tryptic peptides were separated by reversed phase chromatography on a C<sub>18</sub> column (Vydac 218 TP5 4, 25 × 0.46 cm, 300 Å, 5 µm, Separational Group, Vydac). The elution was performed at 37 °C by a mixture of 0.01 M sodium phosphate, pH 2.0, and acetonitrile. The acetonitrile content was increased from 5 to 60% during 50 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The eluate was monitored by UV detection at 210 nm. Each tryptic peptide was subsequently collected, and its amino acid composition was determined.

The tryptic peptides corresponding to amino acids 22–36 were collected from several chromatographic runs of trypsin-treated IGF-I, and the glycosylated analogue was used for further characterizations.

**Large Scale Isolation of a Disaccharide Fragment**—Glycosylated IGF-I (200 mg) was treated with trypsin (7 mg) with stirring in an aqueous 1% ammonium bicarbonate solution (38 ml) at 37 °C for 2 h. After lyophilization, the sample was chromatographed on a Sephadex G-50 column (80 × 2.6 cm) and eluted with 0.1 M ammonium acetate, pH 5.0. The eluate was monitored by differential refractrometry and the carbohydrate content by reaction with phenol-sulfuric acid. The carbohydrate-containing fraction was freeze-dried and subjected to treatment with pronase (7 mg) in 0.1 M phosphate buffer (8 ml), pH 7.4, at 40 °C for 8 h. The material was lyophilized and chromatographed on a column (60 × 1.6 cm) of Bio-Gel P-2 eluted with water. The carbohydrate-containing fraction was freeze-dried, dissolved in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, and analyzed by NMR spectroscopy. A further separation of the material on a column of Bio-Gel P-2 eluted with water showed several peaks which were compared by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.

**Isoelectric Point Determination**—The isoelectric points were determined for a mixture (0.5 mg) of almost equal parts of IGF-I and glycosylated IGF-I. The sample was transferred via gel filtration into the starting buffer (75 mM Tris acetate, pH 9.3; 3.5 ml) before being applied to a Pharmacia chromatofocusing column, Mono P HR 5/20. The elution was done with Polybuffer 96, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., adjusted to pH 6.0 with acetic acid, according to the procedure described by the manufacturer. The pH was continuously registered with a flow-through pH electrode.

**Sugar Analysis**—The monosaccharide composition of glycosylated IGF-I was determined by gas-liquid chromatography (GLC), using selected ion monitoring for detection, on a Hewlett-Packard 5985 MSD instrument. Prior to analysis, a mixture of the sample (50 µg) and myo-inositol (1 µg) as internal standard was treated with 2 M trifluoroacetic acid at 120 °C for 1 h, whereafter the acid was removed by a stream of nitrogen. The released sugars were reduced in a solution of sodium borohydride (10 mg) in aqueous 0.1 M ammonia (1 ml). The solution was neutralized with HCl, and the boric acid was removed by evaporation with 0.6 M HCl in methanol (2 × 2 ml). Acetylation was performed by treatment of the sample with acetic anhydride (0.2 ml) and pyridine (0.2 ml) at 100 °C for 20 min. The product was partitioned between dichloromethane (2 ml) and water (5 ml), and the alditol acetates were injected as a toluene solution. The GC/MS analysis was carried out on a fused-silica capillary column (25 m × 0.2 mm; cross-linked methylsilicon, Hewlett-Packard) with an initial oven temperature of 120 °C, which was increased to 300 °C by 15 °C/min. The ions used for detection were *m/z* 144, 187, and 199 for quantitation of 2-amino hexoses, hexoses, and myo-inositol, respectively.

**Molecular Weight Determination**—The molecular weights of IGF-I and the analogue were compared by polyacrylamide electrophoresis. SDS-PAGE was carried out essentially as described by Merle and Kadenbach (12). The molecular weights were estimated against a myoglobin standard, British Drug House (cyanobromide fragments). IGF-I protein bands were visualized by silver staining (13). Staining for glycoproteins was performed using a concanavalin A-horseradish peroxidase conjugate after electrophoretic transfer of the protein bands (Western blotting) to a nitrocellulose filter (14).

The molecular weight of tryptic peptides (22–36) from IGF-I and the analogue was determined on a Bio-Ion 20 time-of-flight mass spectrometer using a plasma desorption ion source. Lyophilized samples (3 µg) were dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid, mixed with ethanol, and adsorbed on a nitrocellulose filter prior to analysis.

© L. Kenne and S. Strömberg, Carbohydr. Res., submitted for publication.

**Amino Acid Analysis**—Amino acid composition was determined for the IGF-I analogue (36 µg). The sample was hydrolyzed at 110 °C for 24 h in 6 M HCl. The obtained free amino acids were analyzed on an automated amino acid analyzer (LKB 4150 Alpha Plus). The content of cysteine residues was determined separately, after oxidation of the sample in performic acid, using norleucine (20 nmol) as internal standard.

**C-terminal Determination**—The C-terminal amino acid residue was determined by dissolving a sample (0.3 mg) in 0.1 M aqueous N-methylmorpholine, pH 8.5 (1.0 ml). Carboxypeptidase A treated with diisopropyl fluorophosphate (225 µg) was added to the sample, and the solution was incubated at 25 °C for 3 h. The enzymic reaction was stopped by acidification with 0.5 M acetic acid (1.5 ml). After gel filtration on a Pharmacia PD-10 column, a fraction containing the low molecular weight compound was obtained which was analyzed for its content of free amino acids.

**NMR Spectroscopy**—<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were obtained for <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O solutions at 400 and 100 MHz, respectively, on a JEOL GX-400 instrument. Spectra were recorded at 40 °C using acetone (δ<sub>H</sub> 2.225 ppm) and dioxane (δ<sub>C</sub> 67.40 ppm) as internal references. Two-dimensional experiments (COSY, NOESY, ROESY, HMQC) were obtained using standard pulse sequences available in the GX software. A mixing time of 0.5 s was used in the NOESY and ROESY experiments.

**Protein Sequence Analysis**—The protein sequence was analyzed on an Applied Biosystems Protein Sequencer model 477A/120A. Approximately 1 nmol of each tryptic peptide (22–36) from glycosylated and native IGF-I was analyzed.

**Placental Radioreceptor Assay**—Crude membrane fractions were prepared from human placenta and used as matrix. The assay was performed according to Hall et al. (15), using a pool of normal human serum as standard. The serum pool was assigned an average value of 1 unit of IGF-I/ml.

## RESULTS

Human IGF-I was expressed in *S. cerevisiae*, using an MFα1 leader peptide/IGF-I expression plasmid, P539/12 (Fig. 1). This plasmid is an improved version of earlier described IGF-I expression plasmids (10), having an actin (ACT) promoter regulating transcription (16). The total amino acid sequence (155aa) for the MFα1 leader peptide/IGF-I hybrid protein is shown in Fig. 2. The MFα1 leader peptide comprises the first 85 amino acid residues, and IGF-I the remaining 70.

However, when fermentation medium was analyzed for IGF-I, by SDS-PAGE in combination with ConA and anti-IGF-I blotting, a new IGF-I form in addition to authentic IGF-I was found. This form bound ConA, suggesting that it could be a glycosylated form of IGF-I. The two IGF-I forms co-eluted in three different chromatographic systems when purified from yeast fermentation medium. They could, however, be separated by hydrophobic interaction HPLC (HI-HPLC) (Fig. 3). Due to a slight heterogeneity of the first

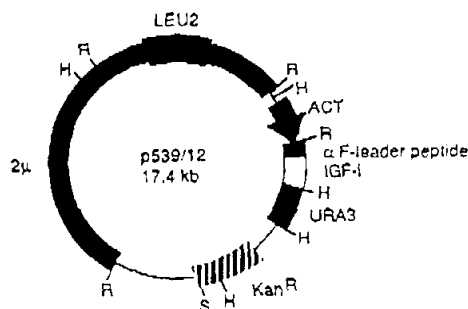


FIG. 1. IGF-I secretion vector p539/12. Yeast DNA (thick line) contains the following genetic elements: actin promoter (ACT), αF-leader peptide (the first 85 amino acids of prepro-MFα1), IGF-I gene, URA3, LEU2, and 2µ ori for replication in yeast. *Escherichia coli* DNA (thin line) contains the following genetic elements: pBR322, PMB9 (origin of replication of *E. coli*), and Tn 903 (kanamycin resistance gene, Kan<sup>R</sup>). S, SalI; B, BamHI; R, EcoRI.



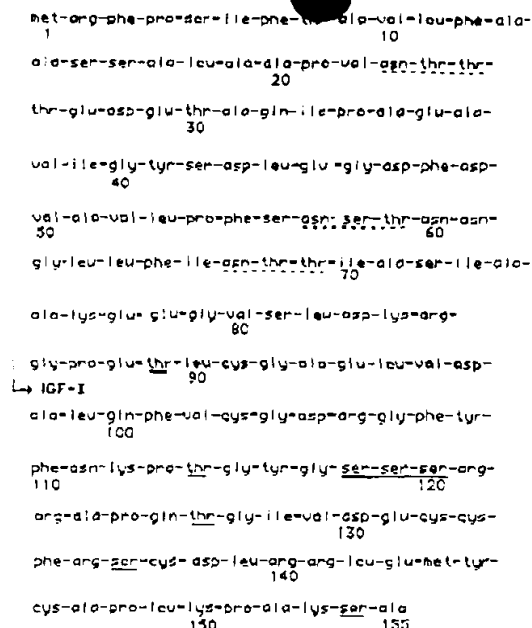


FIG. 2. Yeast  $\alpha$ -mating factor leader peptide IGF-I hybrid protein. N-linked glycosylation sites are underlined (stippled line). Possible O-linked glycosylation sites (Thr/Ser residues) in IGF-I are underlined (thick line). The KEX2 processing site between  $\alpha$ -mating factor leader peptide (Arg<sup>60</sup>) and the first amino acid (Gly) in IGF-I is marked with an arrow.

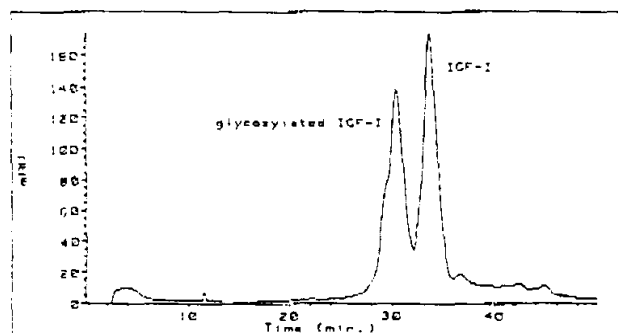


FIG. 3. Separation of IGF-I and glycosylated IGF-I by HI-HPLC. Pooled fractions (2.25 mg) from the Sephadex G-50 purification step, in 30 mM Tris-HCl and 0.7 M sodium sulfate pH 8.0, was applied to a TSK phenyl column. Separation of the two IGF-I forms was achieved by using a linear gradient containing 30 mM Tris-HCl, 5% acetonitrile, and 0.075% Brij 35, pH 8.0. Fractions eluting between 30 and 32 min were collected (glycosylated IGF-I) and used for further characterizations.

eluting peak, fractions were collected (30–32 min) on the descending part of it, in order to obtain the highest possible purity. SDS-PAGE and ConA blotting of the two separated IGF-I forms are shown in Fig. 4. Both preparations showed only one polypeptide band by SDS-PAGE indicating high purity. ConA blotting revealed that only the faster eluting material from the HI-HPLC step bound ConA, which suggested it to be a glycosylated form of IGF-I and which was demonstrated by sugar analysis (see below). This form exhibited a slightly higher apparent molecular weight (400) than native IGF-I (Fig. 4).

Three consensus sequences for N-linked glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) located at Asn<sup>23</sup>, Asn<sup>67</sup>, and Asn<sup>87</sup>, have been recognized in prepro- $\alpha$ -mating factor (ppMFA1) (5). No consensus sequence for N-linked glycosylation is found in the

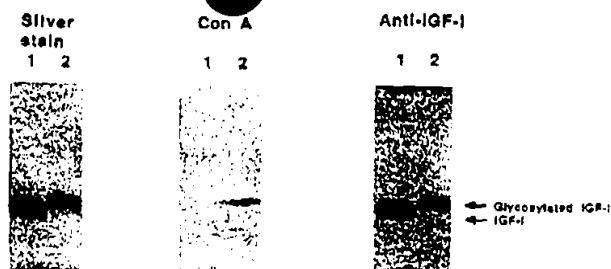


FIG. 4. SDS-PAGE and subsequent ConA and IGF-I blotting of IGF-I and glycosylated IGF-I, obtained from the TSK phenyl column step. Lane 1, IGF-I (TSK phenyl fractions 34–35). Lane 2, glycosylated IGF-I (TSK phenyl fractions 30–32). Each lane was loaded with 0.4  $\mu$ g of protein. After electrophoresis, protein bands were visualized with silver staining or blotted onto two separate nitrocellulose filters. Each filter was incubated with either ConA or anti-IGF-I horseradish peroxidase conjugates.

TABLE I  
Amino acid composition of the different IGF-I forms

	IGF-I (theoretical)	Glycosylated IGF-I	IGF-I
		mol/mol IGF-I	mol/mol IGF-I
Aspartic acid or asparagine	5	5.1	5.2
Threonine	3	3.0	3.1
Serine	5	5.1	5.0
Glutamic acid or glutamine	6	6.1	6.1
Proline	5	5.3	5.3
Glycine	7	7.1	7.1
Alanine	6	6.0	5.9
Cysteine	6	5.9	5.9
Valine	3	2.8	2.8
Methionine	1	0.8	1.0
Isoleucine	1	0.7	0.7
Leucine	6	6.3	6.2
Tyrosine	3	2.7	2.7
Phenylalanine	4	4.0	3.9
Histidine	0	0.0	0.0
Lysine	3	3.0	3.0
Arginine	6	6.3	6.2

IGF-I sequence. However, several possible O-linked glycosylation sites are present which are indicated in Fig. 2.

The amino acid composition of the glycosylated form revealed no significant difference (Table I) from the theoretical value based on the primary sequence for human IGF-I (9). N-terminal and C-terminal determinations gave the expected glycine and alanine residues, respectively, for native human IGF-I (9), showing that the newly synthesized 155aa long hybrid protein was secreted and correctly processed. Furthermore, the isoelectric point of the two forms was determined by Mono P chromatography. pI for IGF-I was found to be 8.25 in agreement with the value reported for synthetic (17) as well as plasma-derived IGF-I (18). The glycosylated form had an almost identical pI, 8.30. This indicates that no post-translational modifications affecting the net charge had occurred and that glycosylation had little effect on the net charge. Finally, the specific activity of IGF-I and glycosylated IGF-I was determined by a placental radioreceptor assay and found to be the same within the experimental error, 18,300 and 20,500 units/mg, respectively. This indicates that the glycosylation does not affect the receptor binding site.

To identify the glycosylation site, a tryptic fingerprint method was used. The method involves digestion of IGF-I with trypsin and subsequent separation of the tryptic peptides by reversed phase HPLC. Using this method, 14 different



peptides could be separated (Fig. 5). Each peptide was isolated and identified by amino acid analysis. Due to the commonly observed nonspecific chymotryptic activity of trypsin preparations, additional peptides other than the theoretical five were obtained. When the glycosylated form of IGF-I was analyzed, shorter elution times of tryptic peptides 22–36 and 22–31, in comparison to those from IGF-I, were found. Peptide 22–36 from IGF-I and glycosylated IGF-I was isolated and used for protein sequence analysis. The analysis was carried out for 15 steps covering the entire peptide length. The results obtained showed that there was no sequence difference between the two IGF-I forms, except in step 8 corresponding to Thr<sup>29</sup> (Fig. 6). The expected PTH-Thr<sup>29</sup> derivative was not found in this step when the tryptic peptide isolated from glycosylated IGF-I was analyzed. Only a small amount of proline corresponding to amino acid 28 was found which was due to the known low cleavage efficiency at proline residues. Similar amounts of proline was also found in cleavage step 8, when the nonglycosylated tryptic peptide 22–36 was sequenced. Furthermore, no sequence difference was observed in the subsequent steps from Glu<sup>30</sup> to Arg<sup>36</sup> between the two forms. A summary of the sequence data is given in Table II. The sequence analysis suggests that the glycosylation site is Thr<sup>29</sup> and that the glycosylation is of the O-linked type, previously shown to occur in yeast on threonine or serine residues (19–21).

The carbohydrate moiety bound to the IGF-I polypeptide backbone was analyzed after acid treatment. Released sugars in the form of alditol acetates were analyzed by GC/MS. The only sugar found was mannose. No GlcNAc was found, usually associated with N-linked oligosaccharides (22). The content of mannose was determined to 4.5%, corresponding to approximately 2 mannose residues per molecule of IGF-I. The estimated stoichiometry was confirmed by molecular weight determination of the glycosylated tryptic peptide 22–36 using

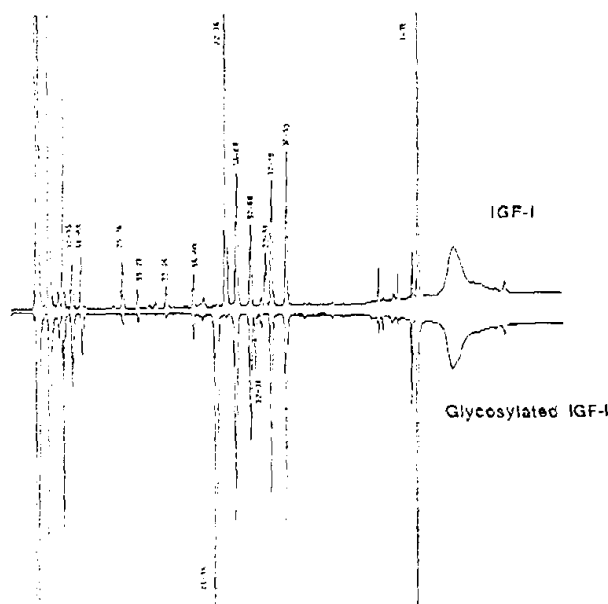


FIG. 5. Tryptic fingerprint analysis of IGF-I and glycosylated IGF-I. The protein samples (0.5 mg/ml) were digested with TPCK-treated trypsin at 37 °C for 2 h. Tryptic peptides were subsequently separated by reversed phase HPLC on a Vydac C<sub>18</sub> column. The peptides were eluted using a linear gradient (5–60%) of acetonitrile in 0.01 M sodium phosphate pH 2.0 at 37 °C. Detection wavelength was 210 nm.

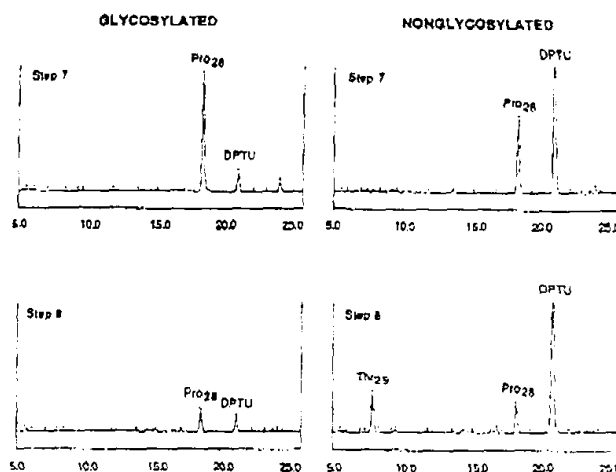
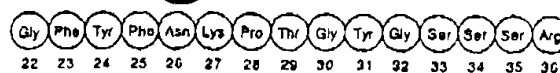


FIG. 6. Protein sequence analysis of tryptic peptide 22–36 isolated from IGF-I and glycosylated IGF-I. Approximately 1 nmol of each tryptic fragment was analyzed. The sequence analysis was carried out for 15 steps. Only sequence steps 7 and 8, corresponding to proline-28 and threonine-29 in the IGF-I sequence, are shown. Diphenylthiourea eluted at 21.1 min. The difference in diphenylthiourea content observed is due to different water content in the system. Identified PTH-amino acids are indicated by + in the chromatograms. Retention times are given in minutes. The tryptic peptide sequence analyzed is given above.

TABLE II  
Sequence data of IGF-I tryptic peptides 22–36

Step	Amino acid in IGF-I sequence	PTH-amino acid	
		Tryptic peptide	Glycosylated tryptic peptide
<i>pmol</i>			
1	Gly <sup>22</sup>	Gly (989)	Gly (928)
2	Phe <sup>23</sup>	Phe (1027)	Phe (1261)
3	Tyr <sup>24</sup>	Tyr (1060)	Tyr (1349)
4	Phe <sup>25</sup>	Phe (1022)	Phe (1236)
5	Asn <sup>26</sup>	Asn (684)	Asn (1126)
6	Lys <sup>27</sup>	Lys (959)	Lys (1346)
7	Pro <sup>28</sup>	Pro (615)	Pro (998)
8	Thr <sup>29</sup>	Thr (551)	— <sup>a</sup>
9	Gly <sup>30</sup>	Gly (585)	Gly (830)
10	Tyr <sup>31</sup>	Tyr (590)	Tyr (900)
11	Gly <sup>32</sup>	Gly (581)	Gly (768)
12	Ser <sup>33</sup>	Ser (287)	Ser (465)
13	Ser <sup>34</sup>	Ser (332)	Ser (508)
14	Ser <sup>35</sup>	Ser (263)	Ser (450)
15	Arg <sup>36</sup>	Arg (128)	Arg (113)
Repetitive yields		%	
Gly <sup>22</sup> , Gly <sup>24</sup> , Gly <sup>25</sup>		94.48	97.39
Phe <sup>23</sup> , Phe <sup>25</sup>		99.76	99.01
Tyr <sup>24</sup> , Tyr <sup>31</sup>		91.98	94.39
Ser <sup>33</sup> , Ser <sup>34</sup> , Ser <sup>35</sup>		95.86	96.93
Average		95.52	97.43

<sup>a</sup> The level of PTH-threonine found in the glycosylated tryptic peptide was approximately 1% (9 pmol). Values are corrected against background noise.

mass spectrometry. A mass difference of 324 between the two peptides was observed in the mass spectra (Fig. 7), corresponding to 2 mannose residues per IGF-I molecule.

Glycosylated IGF-I was subjected to enzymatic digestion to obtain larger quantities of a glycopeptide, containing only a





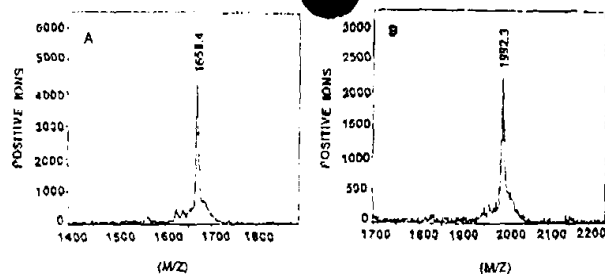


FIG. 7. Mass spectra of tryptic peptides 22-36 showing the molecular ion region. The peptides were isolated by HPLC from IGF-I (A) and glycosylated IGF-I (B) digested by trypsin. Mass spectra were obtained on a time-of-flight mass spectrometer using a plasma desorption ion source.

TABLE III

$^1\text{H}$  NMR chemical shifts of signals from the  $\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow2)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow3)\text{Thr}$  part of the isolated glycopeptide

The spectrum was obtained at 40 °C and pD 5. The chemical shifts are given relative to internal acetone (2.225 ppm) and were obtained from the two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  shift correlated spectrum.

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
$\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	4.95	4.02	3.81	3.63	3.73*	3.73	3.88
$2)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	5.12	3.87	3.89	3.71	3.68*	3.73	3.88
$3)\text{Thr}$		4.47	4.31	1.28			

\* The assignments can be interchanged.

TABLE IV

$^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of signals from the  $\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow2)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow3)\text{Thr}$  part of the isolated glycopeptide and the methyl glycoside of  $\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow2)\alpha\text{-D-Manp}$

Spectra were obtained at 40 °C. The chemical shifts are given relative to internal dioxane (67.4 ppm).

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
$\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	103.1	70.8	71.3	67.6	74.2	61.9
$2)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	100.5	79.8	70.8	67.9	74.2	61.9
$3)\text{Thr}$	— <sup>a</sup>	58.8	76.6	18.5		
Methyl glycoside of $\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow$	103.0	71.7	71.7	67.8	74.1	61.8
$2)\alpha\text{-D-Manp}$	100.1	79.3	70.8	67.8	73.4	61.9

<sup>a</sup> The signal could not be detected due to the low S/N ratio.

<sup>b</sup> The signal for the OMe group was observed at 55.7 ppm.

limited number of amino acid residues, for NMR spectroscopic studies. The sample was first treated with trypsin and subsequently chromatographed on Sephadex G-50 to remove nonglycosylated peptides. The fraction containing the glycosylated peptide was further degraded by treatment with pronase. Gel filtration of this material yielded a carbohydrate-containing fraction which was analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. By different two-dimensional experiments, all  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signals could be assigned (Tables III and IV). The spectra revealed that the material consisted mainly of 1 threonine and 2  $\alpha$ -linked mannopyranosyl residues. In the NOESY and ROESY (Fig. 8) spectra, cross-peaks between the signals from the anomeric protons at 4.95 ppm and 5.12 ppm and the signals from H-2 (3.87 ppm) and H-3Thr (4.31 ppm), respectively, were obtained. These inter-residue NOE contacts showed the sequence  $\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow2)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow3)\text{Thr}$  (Fig. 9). The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the isolated product was similar to the spectrum (Table IV) obtained from the methylglycoside of  $\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow2)\alpha\text{-D-Manp}$  (23). Only minor differences for some of the signals were observed which probably are due to the different aglycones of the two samples. In addition to signals from the disaccharide minor signals for anomeric protons of  $\alpha\text{-D-mannopyranosyl}$  residues at 5.23,

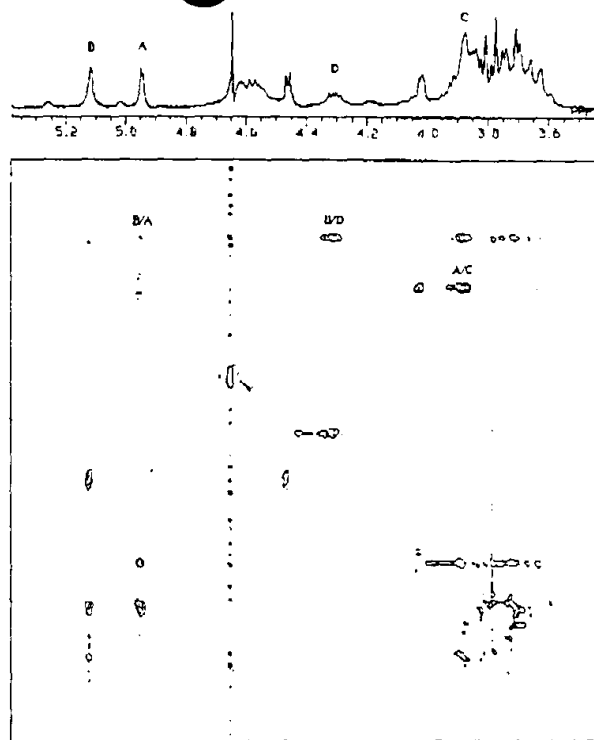


FIG. 8. A two-dimensional ROESY spectrum of the glycosylated fragment with a  $^1\text{H}$  NMR spectrum along one of the axes. The spectrum shows the inter-residue NOE contacts between anomeric protons in the Manp(1 $\rightarrow$ ) (A) and  $\rightarrow$ 2) Manp(1 $\rightarrow$ ) (B) residues and protons in the linkage positions of the  $\rightarrow$ 2) Manp(1 $\rightarrow$ ) (C) and threonine (D) residues.

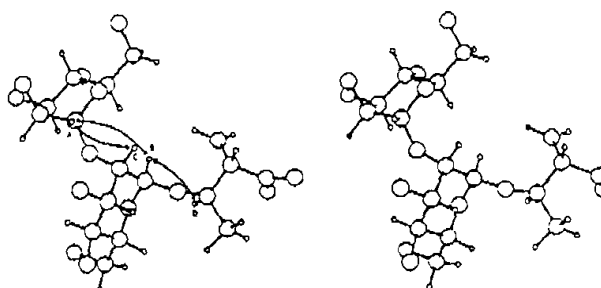


FIG. 9. Molecular model of  $\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow2)\alpha\text{-D-Manp}(1\rightarrow3)\text{Thr}$ . The structure is the main carbohydrate moiety in glycosylated IGF-I, produced in *S. cerevisiae*. The energy of the molecule is minimized by hard-sphere exo-anomeric effect calculations. Inter-residue NOE contacts in the ROESY spectrum are shown by arrows in the structure. The HSEA program (24, 25) was used to estimate the minimum energy conformation of the glycosidic linkages of the disaccharide. The program accounts for nonbonded interactions as expressed by the Kitaigorodsky algorithm, together with a term for the exoanomeric effect.

5.13, 5.03, and 4.95 ppm are observed. This indicates that also mannose oligosaccharides of higher molecular weights are present. These larger oligosaccharides were enriched in the earlier eluted fractions on the column of Bio-Gel P-2. The fractions showed also some heterogeneity for signals from amino acid residues indicating that the glycopeptides consist of several different oligopeptides.



A *de novo* glycosylated variant of human IGF-I has been synthesized in yeast. The glycosylated form was found to have  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3) substituted to threonine-29. No other post-translational modifications were found using N- and C-terminal determination, tryptic fingerprint analysis, protein sequencing of tryptic fragments and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy analysis. Furthermore, the glycosylated IGF-I form, isolated from yeast media, was found to be correctly processed, as was the IGF-I, having a glycine residue in the N-terminal end. The addition of 2 mannosyl residues to threonine-29, however, did not alter its radioreceptor activity (20,500 units/mg) as compared to IGF-I, suggesting that threonine-29 does not participate in receptor binding. This demonstrates that subtle post-translational modifications such as glycosylations etc., which might take place during expression of foreign proteins in yeast or other cell types, may not be readily detected in radioreceptor assays or radioimmunoassays. Several other techniques, such as HI-HPLC, ConA blotting, protein sequencing,  $^1\text{H}$  NMR analysis, and mass spectrometry have to be applied to ascertain their detection.

The observation that human IGF-I will be glycosylated in yeast but not in man (9) demonstrates differences in substrate specificity between the yeast and mammalian mannosyltransferase enzymes. O-Linked glycosylation in yeast, although little studied (21, 22), has been shown to occur via a dolichol-monophosphate-mannose (Dol-P-Man) intermediate step (20). The mannosyl residue is subsequently transferred from Dol-P-Man to serine or threonine residues, a reaction occurring in the endoplasmic reticulum (26). The structural requirements for this reaction in yeast have been studied in an *in vitro* assay using synthetic hexapeptides as substrates (27). The results showed that the introduction of a proline residue on the N-terminal side of a serine or a threonine residue increased the degree of glycosylation. Proline residues are known to introduce  $\beta$ -turns in proteins, perhaps thereby opening up the structure sufficiently to permit O-linked glycosylation. Interestingly, the only threonine or serine residue in the IGF-I sequence that has an N-terminally located proline residue is threonine-29 which also is the only amino acid to become glycosylated. The acceptor sequence around threonine-29 (-Asn-Lys-Pro-Thr<sup>29</sup>-Gly-) is different from that around threonine-41 (-Ala-Pro-Glu-Thr<sup>41</sup>-Gly-), although the latter also contains an N-terminally located proline. However, this proline is not located next to threonine-41. The lack of glycosylation at threonine-41 demonstrates high substrate specificity for the yeast mannosyltransferase enzyme. The substrate specificity for the corresponding human enzyme has been studied to some degree. Fiat *et al.* (28) reported that, of 10 O-linked glycosylation positions in human casein, 9 were located in  $\beta$ -turns (proline), supporting the above results. However, a detailed knowledge of the consensus sequence specifying an O-linked glycosylation site in yeast and in higher

eucaryotic cells is not yet available. Work in our laboratory is in progress to delineate the structural requirements for O-linked glycosylation in yeast by specific amino acid mutations around threonine-29.

**Acknowledgments**—We thank Sighild Strömberg for performing the sugar analyses and Dr. Per-Erik Janason for the hard-sphere exo-anomeric effect calculation of the oligosaccharide.

## REFERENCES

- Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Heberlein, U. A., Maslars, Z. R., Mullenbach, G. T., Urdea, M. S., Valenzuela, P., and Barr, P. J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4642-4646
- Van der Straten, A., Falque, J.-C., Loriau, R., Bollen, A., and Cabazon, T. (1986) *DNA (NY)* 5, 129-136
- Murakami, H., Yabusaki, Y., and Ohkawa, H. (1986) *DNA (NY)* 5, 1-10
- Schekman, R. (1982) *Trends Biochem. Sci.* 7, 243-246
- Julius, D., Schekman, R., and Thorner, J. (1984) *Cell* 36, 309-318
- Kurjan, J., and Herskowitz, I. (1982) *Cell* 30, 933-943
- Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G., and Thorner, J. (1983) *Cell* 32, 839-852
- Brake, A. J., Julius, D. J., and Thorner, J. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3, 1440-1450
- Rinderknecht, E., and Humbel, R. E. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2769-2776
- Ernst, J. F. (1986) *DNA (NY)* 5, 483-491
- Deleted in proof
- Merle, P., and Kadenbach, B. (1980) *Eur. J. Biochem.* 105, 499-507
- Johansson, S., and Skoog, B. (1987) *J. Biochem. Biophys. Methods* 14 (suppl.), 33
- Kijimoto-Ochiai, S., Katagiri, Y. U., and Ochiai, H. (1985) *Anal. Biochem.* 147, 222-229
- Hall, K., Taakano, K., and Fryklund, L. (1974) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39, 973-976
- Himmelfarb, H. J., Maicas, E., and Friesen, J. D. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 816-822
- Li, C. H., Yamashiro, D., Gospodarowicz, D., Kaplan, S. L., and Van Vliet, G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 2216-2220
- Rinderknecht, E., and Humbel, R. E. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2365-2369
- Nakajima, T., and Ballou, C. E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7679-7684
- Sharma, C. B., Babczinski, P., Lehle, L., and Tanner, W. (1974) *Eur. J. Biochem.* 46, 35-41
- Tanner, W., and Lehle, L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 906, 81-99
- Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L. E., and Jackson, B. J. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 915-944
- Ogawa, T., and Sasajima, K. (1981) *Carbohydr. Res.* 97, 205-227
- Lomieux, R. U., Bock, K., Delbaere, L. T. J., Koto, S., and Rao, V. S. (1980) *Can. J. Chem.* 58, 631-653
- Thøgersen, H., Lemieux, R. U., Bock, K., and Meyer, B. (1982) *Can. J. Chem.* 60, 44-57
- Haselbeck, A., and Tanner, W. (1983) *FEBS Lett.* 158, 335-338
- Lehle, L., and Bause, E. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 799, 246-251
- Fiat, A.-M., Jollès, J., Aubert, J.-P., Louchoux-Lefebvre, M. H., and Jollès, P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 111, 333-339



## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-156880

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)6月15日

C 12 N 1/19

7421-4B

//C 12 N 15/31

C 12 R 1:865)

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 有 請求項の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 サツカロマイセスセレビスエ popl

⑯ 特 願 昭63-311943

⑰ 出 願 昭63(1988)12月12日

⑱ 発 明 者 酒 井 明 東京都町田市成瀬2丁目9番4号13-306

⑲ 発 明 者 菱 沼 文 男 神奈川県川崎市麻生区栗平2丁目14番28号

⑳ 発 明 者 清 水 由 紀 東京都町田市金森681番地1

㉑ 出 願 人 工 業 技 術 院 長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

## 明 細 書

## 1 発 明 の 名 称

サツカロマイセス セレビスエ popl

## 2 特 許 請 求 の 範 囲

(1) サツカロマイセス、セレビスエ YNN27 の変異株であって、蛋白質を高度に分泌する微生物第10417号として寄託されたサツカロマイセス、セレビスエ popl。

## 3 発 明 の 詳 細 な 説 明

(産業上の利用分野)

本発明は、蛋白質を高度に分泌する新規な酵母サツカロマイセス、セレビスエ poplに関する。

(従来の技術と問題点)

酵母は、細胞の構造や機能が高等生物の特徴を備え、また食品、医薬品、飼料等の原料として人間の日常生活と深い係わり合いを持つ有用な微生物であり、遺伝子工学における宿主としての開発が期待されている。

しかし、通常酵母を宿主として遺伝子組換え技術により有用物質(異種蛋白質)を生産する場合、

酵母の細胞表層は細胞膜の外側に強固な細胞壁を有するため、生産された異種蛋白質の精製が困難な場合が多く、精製を簡略化するために生産物を菌体外に分泌させる試みが種々提案されているが、いまだ満足し得る結果は得られていない。

(問題点を解決するための手段)

本発明者等は、酵母サツカロマイセス、セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)を宿主として遺伝子組換え技術により異種蛋白質を生産する際、生産された物質を効率よく分泌させることのできる宿主を得ることを目的として研究の結果、それ自体は蛋白質を分泌する能力が小さい周知の酵母サツカロマイセス、セレビスエ YNN27 の染色体に、ある種の組み込み型プラスミドを挿入し、次いでエチルメタンスルホネートで処理することによって得られた突然変異株が、特定培地中で異種蛋白質を高度に分泌することを確認し本発明を達成した。

即ち、本発明の要旨は、サツカロマイセス、セレビスエ YNN27 の変異株であって、蛋白質を高度



に分泌する糖工研菌寄第10417号として寄託されたサッカロマイセス セレビスエ poplに存する。

本発明を詳細に説明するに、本発明の酵母サッカロマイセス セレビスエ poplは、糖工研菌寄第10417号(FERM P-10417)として寄託されており、酵母サッカロマイセス セレビスエ YNN27[*Journal of Molecular Biology*, 158巻, 157~179頁(1982年)][糖工研菌寄第10419号(FERM P-10419)]を親株とし、以下に述べる方法により調製される変異株である。

(1) [サッカロマイセス セレビスエ YNN27染色体へのプラスミド pSAK031の直鎖状DNAの挿入]

まずサッカロマイセス セレビスエ YNN27に、後記する方法によって調製されたプラスミド pSAK031の直鎖状DNAを導入して、これを YNN27の染色体に挿入する。

ここに使用されるプラスミド pSAK031は、第2図に示すように、サッカロマイセス セレビスエのホスホグリセレートキナーゼ遺伝子として知られている PGK遺伝子[*Nucleic Acids Research*, 10

ーミネーター配列並びに TRP1、2 $\mu$ 及び pBR322の oriとアンピシリン耐性遺伝子(Ap<sup>r</sup>)を有し、かつリーダー配列とターミネーター配列との間にヒト $\beta$ -エンドルフィン遺伝子が挿入されている公知のプラスミド pRE1059を使用し、そのプロモーター配列をホスホグリセレートキナーゼ(PGK)のプロモーター配列で置換したプラスミド pRE1078を作製する。

即ち、PGKのプロモーター配列とターミネーター配列を含む公知のプラスミド pMA91[*Gene*, 24巻, 1~14頁(1983年)]を Bgl II で切断し、DNAポリメラーゼ I で平滑末端とした後、EcoRI で切断して PGKのプロモーター配列を含む1.5 kbの EcoRI - (Bgl II)断片(I)を単離する。

一方、前記の pRE1059を Hinf I で切断し、末端を充填した後、Sal I で切断して MF $\alpha$ 1の5'非翻訳領域とリーダー配列を含む337 bpの断片(II)を単離する。また、pRE1059のヒト $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を含む Sal I - Aat II断片(III)と、TRP1、2 $\mu$ 及び pBR322の ori並びに Ap<sup>r</sup>領域を含む EcoRI

断片, 23号, 7791~7808頁(1983年)]のプロモーター、酵母の性接合因子である $\alpha$ 因子(MF $\alpha$ 1)の分泌シグナル、マウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子及び MF $\alpha$ 1遺伝子のターミネーター領域を、周知のプラスミド Yip5に挿入することによって得られるものであり、例えば以下の工程により調製される。

[プラスミド pSAK031の調製]

(a) プラスミド pSAK009の調製

周知のプラスミド Yip5[*Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 76巻, 1035~1039頁(1979年)]を BamHI で切断し、Mung beanヌクレアーゼで末端を平滑化して BamHI 切断部位を破壊した後、自己連結させてプラスミド pSAK009を調製する(第2図参照)。

(b) プラスミド pRE1078(7.5 kb)の作製

特開昭63-133987号公報及び[*Molecular and Cellular Biology*, 7巻, 3185~3193頁(1987年)]に記載されている方法で作製した、サッカロマイセス セレビスエの $\alpha$ フェロモン遺伝子 MF $\alpha$ 1のプロモーター配列、リーダー(分泌シグナル)配列、タ

ーミネーター断片(IV)とを夫々の制限酵素で切断して得る。上記で得られる(I)~(IV)を同時に結合することにより pRE1078(7.5 kb)を作製する(第1図参照)。

(c) プラスミド pSAK028の調製

pRE1078を BamHI で切断し、再結合させることにより、ヒト $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を除去した pSAK027を調製する。この pSAK027を EcoRI で切断して、PGKのプロモーター、MF $\alpha$ 1の分泌シグナル配列及び MF $\alpha$ 1のターミネーター配列を含む2.1 kbのDNA断片を単離する。このDNA断片を、前記の pSAK009を EcoRI で切断して得られた5.5 kbのDNA断片と結合させて pSAK028を調製する(第2図参照)。

(d) プラスミド pSAK031の調製

マウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子(それ自身のシグナル配列を除いたもの)を含む周知のプラスミド pSAK011[*Genetics*, 119巻, 499~508頁(1988年)]を BamHI で切断し、得られる約1.5 kbのマウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子断片を、前記プラスミド





pSAK028のBamHI部位に連結させ、プロモーターとアミラーゼ遺伝子が同方向で結合したものを選択しプラスミドpSAK031とする(第2図参照)。

#### [YNN27へのpSAK031の導入]

以上のようにして得られたプラスミドpSAK031をSluIで切断して直鎖状DNAとし、これをYNN27へ導入して、YNN27の第V番の染色体に、pSAK031の直鎖状DNAが1コピー組み込まれた菌株(以下YNN27/pSAK031/Sという)を得る。

pSAK031の直鎖状DNAのYNN27への導入は、それ自体周知の方法によって実施される。例えば、特開昭58-28478号公報に記載されている方法に従い、YNN27を適当な培地、例えばYPD培地を用いて培養後集菌し、緩衝液に懸濁し、これに例えばリチウム、ルビジウム又はセシウム等の金属イオンを加えた後、前記のpSAK031をSluIで切断した直鎖状DNA及びポリエチレングリコール水溶液を添加し、次いで40℃程度で短時間熱処理し、滅菌水で洗浄する。この方法は、菌株のプロトプラスト化処理を要しないので酵母へのDNAの導入法として特に

好ましい。

このように処理した細胞を滅菌水に懸濁して、CSM培地からウラシルを除去したプレート上にまき培養する。プレート上に成育したいくつかのコロニーをYPD培地で培養した後、DNAを抽出し、得られたDNAをサザンハイブリダイゼーション法により解析し、pSAK031の直鎖状DNAが1コピー組み込まれたYNN27/pSAK031/Sを選択する。

#### (2) [エチルメタンスルホネートによる処理]

以上のようにして調製したYNN27/pSAK031/Sは、次いで酵母菌体の突然変異誘発剤として知られているエチルメタンスルホネート(以下EMSという)を用いて[Methods in yeast genetics, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1978年)]に記載されている方法により処理してサッカロマイセスセレビシエ popI株を調製する。

即ち、前記で得られたYNN27/pSAK031/SをYPD培地で培養して緩衝液で洗浄後、所定の細胞濃度に調製し、これに所定量のEMSを加えて処理し、

EMS処理菌を希釈してYPD培地上で培養し、生成する約8000個のコロニーを得る。各コロニーの菌をYPDプレート上に植菌して、生ずるハローの大きさを比較し、最も大きいハローを生ずるpopI株を選択採取する。

以上のようにして得られた本発明のpopI株は、後記実施例に示すように、アミラーゼを高い効率で分泌する。なお、EMSによる処理前のYNN27/pSAK031/Sもアミラーゼを分泌するが、popI株のアミラーゼ分泌量は、YNN27/pSAK031/Sのアミラーゼ分泌量を遙かに凌駕する。

また、本発明のpopI株にアミラーゼ遺伝子を含む多コピープラスミドを導入すれば、アミラーゼを一層高い効率で分泌させることができる。

例えば本発明のpopI株に、PGKのプロモーター、MFα1の分泌シグナル、マウスのα-アミラーゼ及びMFα1のターミネーター配列を含む多コピープラスミドとしてよく知られている、pMT56[Biochemical and Biophysical Research Communications, 144巻, No. 2, 613~619頁(1987年)]を導入し

た場合には、後記実施例に示すように、野性型株にpMT56を導入したものに比し約4倍量のアミラーゼを分泌する。

なお、popI株へのpMT56の導入は、前に述べたYNN27株へpSAK031の直鎖状DNAを導入した場合と同様の方法により行ない、CSM培地からトリプトファンを除去したプレート上にまいて培養し、このプレート上に成育したコロニーを単離すればよい。

#### (実施例)

以下本発明を実施例について更に詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限りこれ等の実施例に限定されるものではない。

なお、以下の実施例における操作は、特に記載する場合を除き、次のI~Vの方法によった。

#### I [制限酵素によるDNAの切断と回収]

制限酵素による切断用緩衝液は、下記3種類を用い(1)~(3)の使い分けはAdvanced Bacterial Genetics(1981年)(Cold spring Harbor, New York)に従った。また切断条件は、2単位/μg DNAの



制限酵素を用い、37℃または65℃で30分間処理する。

次いで、TE緩衝液(10 mMのトリス塩酸 pH 8.0及び1 mMのEDTAからなる)で飽和したフェノールで1回抽出し、エーテルでフェノールを除き2倍容のエタノールを加えて-20℃で30分間放置した後、遠心分離してDNAを回収する。

#### (1) 低塩濃度緩衝液

10 mMのトリス塩酸(pH 7.4)、10 mMの硫酸マグネシウム及び1 mMのジチオスレイトールからなる。

#### (2) 中塩濃度緩衝液

50 mMのNaCl、10 mMのトリス塩酸(pH 7.4)、10 mMの硫酸マグネシウム及び1 mMのジチオスレイトールからなる。

#### (3) 高塩濃度緩衝液

100 mMのNaCl、50 mMのトリス塩酸(pH 7.4)及び10 mMの硫酸マグネシウムからなる。

II [DNA断片の仔牛小腸アルカリリンフォスファターゼ(CIAP)による処理]

リガーゼ反応によるプラスミドDNAの自己連結

処理した後、2  $\mu$ lの25% SDS溶液、10  $\mu$ lの0.5 M トリス塩酸緩衝液(pH 9.5)及び10  $\mu$ lの8 M LiClを添加する。

次いでこれに150  $\mu$ lのフェノール及びクロロホルム混合液(1:1)を加えて抽出処理し、水層を採取して10  $\mu$ lの3 M酢酸ナトリウムと200  $\mu$ lのエタノールを加え、-20℃に冷却し、遠心分離して沈澱したDNAを回収する。

#### IV [T4 DNAリガーゼによる連結]

連結する2種のDNA断片は、1  $\mu$ g/10  $\mu$ lになるように連結用緩衝液[66 mMのトリス塩酸(pH 7.5)、6.6 mMの塩化マグネシウム、10 mMのジチオスレイトールからなる]に溶解し65℃で10分間処理した後、4℃で86  $\mu$ MのATP(アデノシントリフォスフェート)を加え、更にT4 DNAリガーゼを、粘着末端の場合は0.1単位/ $\mu$ g DNA、また平滑末端の場合は1単位/ $\mu$ g DNAになるように加えて4℃で18時間反応させた後、65℃で10分間処理する。

#### V [酵母の形質転換(KU法)]

酵母サッカロマイセス・セレビシエを10 mlの

を阻止するため、リガーゼ反応に先だって、プラスミドDNAの制限酵素による切断断片をCIAPで処理する。

制限酵素で切断したプラスミドDNA(10 p mol 5'末端)を50  $\mu$ lのCIAP緩衝液[50 mMのトリス塩酸(pH 9.0)、1 mMの塩化マグネシウム、0.1 mMの塩化亜鉛及び1 mMのスベルミジンからなる]に溶解し、1 p mol末端当り、0.01単位のCIAPを加え37℃で30分間反応後、10  $\mu$ lの0.1 M トリス塩酸(pH 8.0)、1 M NaCl、10 mM EDTA、5  $\mu$ lの10% SDS、40  $\mu$ lの水を加え、65℃で15分間保持する。冷却後TE緩衝液で飽和したフェノールで抽出処理し、エーテルでフェノールを除去し、エタノール沈澱によりプラスミドDNAを回収する。

III [Mung beanヌクレアーゼによるDNA粘着末端の除去]

粘着末端を持つDNAを、30 mMの酢酸ナトリウム(pH 4.6)、50 mMのNaCl及び1 mlのZnCl<sub>2</sub>からなる緩衝液100  $\mu$ lに溶解し、これに1  $\mu$ l(2 units/ $\mu$ l)のMung beanヌクレアーゼを加えて37℃で10分間

YEPO培地中で30℃で一時間培養し、集菌して一回TE緩衝液で洗浄した後、同緩衝液に懸濁し、細胞数が $2 \times 10^6$  cells/mlとなるようにする。

この懸濁液500  $\mu$ lに同量の0.2 M 酢酸リチウム(pH 7.5)を加え30℃で1時間保持した後、100  $\mu$ l宛試験管に分注し、0℃でこれにDNAを添加し0℃で30分間混合する。100  $\mu$ lの70%ポリエチレングリコール4000を含むTE緩衝液を加え、よく混合した後30℃で1時間、次いで42℃で5分間保持し、遠心分離して集菌し、滅菌水で洗浄する。

これを500  $\mu$ lの滅菌水に懸濁し、100  $\mu$ l宛を選別培地上に接種し、30℃で3~4日間培養して形質転換株を得る。

#### 実施例 1

##### (1) プラスミド pSAK031 の調製

##### (a) プラスミド pSAK009 の調製

プラスミド Ylp5 を BamHI で切断し、Mung beanヌクレアーゼで末端を平滑化して BamHI 切断部位を破壊した後、T4 DNAリガーゼを用いて自己連結させてプラスミド pSAK009 を調製した(第2図)。



## (b) プラスミド pRE1078 (7.5 kb) の作製

PGKのプロモーター配列とターミネーター配列を含むプラスミド pMA91 を Bgl II で切断し、DNAポリメラーゼ I で平末端とした後、EcoRI で切断して PGK のプロモーター配列を含む 1.5 kb の EcoRI - (Bgl II) 断片 (I) を単離した。一方、pRE1059 を Hinf I で切断し、末端を充填した後、Sal I で切断して MF $\alpha$ 1 の 5' 非翻訳領域とリーダー配列を含む 337 bp の断片 (II) を単離した。また pRE1059 の  $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を含む Sal I - Aat II 断片 (III) と、TRP1、2  $\mu$ m 及び pBR322 の ori、Ap<sup>r</sup> を含む EcoRI - Aat II 断片 (IV) とを、夫々の制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、目的のバンドを溶出することにより得た。上記で得た (I) ~ (IV) の断片を同時に T4 DNA リガーゼで結合して pRE1078 (7.5 kb) を作製した (第 1 図)。

## (c) プラスミド pSAK028 の調製

上記 (b) で得た pRE1078 を BamHI で切断し、T4 DNA リガーゼで再結合させることにより、pRE1078

からヒト  $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を除去した pSAK027 を得た。この pSAK027 を EcoRI で切断して、PGK のプロモーター、MF $\alpha$ 1 の分泌シグナル配列及び MF $\alpha$ 1 のターミネーター配列を含む 2.1 kb の DNA 断片を単離した。この DNA 断片を、前記 (a) で得た pSAK009 を EcoRI で切断して得られた 5.5 kb の DNA 断片と結合させて pSAK028 を調製した (第 2 図)。

## (d) プラスミド pSAK031 の調製

マウスの  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (それ自身のシグナル配列を除いたもの) を含むプラスミド pSAK011 を BamHI で切断し、得られた約 1.5 kb のマウスの  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子断片を、前記 (c) で得た pSAK028 の BamHI 部位に、T4 DNA リガーゼを用いて連結させ、プロモーターとアミラーゼ遺伝子が同方向で結合したものを選別してプラスミド pSAK031 を得た (第 2 図)。

## (2) サッカロマイセス セレビスエ YNN27 へのプラスミド pSAK031 の導入

pSAK031 を StuI で切断して直鎖状 DNA とした。

YNN27 を YPD 培地で対数増殖期の中期まで培養し、

1 M の酢酸リチウム水溶液で 1 回洗浄した後に細胞数を測定し、 $1 \times 10^7$  細胞 / 12  $\mu$ l になるように 1 M の酢酸リチウム水溶液を加えた。

その 12  $\mu$ l ( $1 \times 10^7$  細胞) を採取してエッペンドルフチューブに移し、これに 2  $\mu$ g の前記 pSAK031 の直鎖状 DNA 及び 45  $\mu$ l の 50% のポリエチレングリコール水溶液を添加混合して 30℃ で 45 分間保持し、次いで 42℃ で 5 分間熱処理した後、滅菌水で洗浄した。

このように処理した細胞を 100  $\mu$ l の滅菌水に懸濁して、CSM 培地からウラシルを除去したプレート上にまき、30℃ で 3 日間培養した。プレート上に成育したいくつかのコロニーを 5  $\mu$ l の YPD 培地で一夜間培養した後、DNA を抽出し、得られた DNA をサザンハイブリダイゼーション法により解析して、pSAK031 の直鎖状 DNA が 1 コピー組み込まれた YNN27 / pSAK031 / S を選別した。

## (3) YNN27 / pSAK031 / S の EMS による処理

前記 (2) で得られた YNN27 / pSAK031 / S を YPD 培地で一夜間培養し、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝

液 (pH 7.0) で洗浄後、 $5 \times 10^6$  細胞 / ml の濃度になるように 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液を加え、更に 30  $\mu$ l の EMS を添加して 30℃ に保持し、5 分間隔で 100  $\mu$ l ずつ揉み、4 ml の 5% チオ硫酸ナトリウム水溶液中に加えて EMS を中和した。

5 分間隔で採取した EMS 処理液を夫々 10000 倍に希釈し、その 200  $\mu$ l を YPD 培地 (プレート) 上にまき、24℃ で 2 日間培養した。この間、チオ硫酸ナトリウム水溶液中に懸濁している細胞はアルミホイルで遮光して 8℃ に保存した。2 日後に YPD プレート上に出現したコロニーの数を計測して生存率を決定した。生存率が 40~50% になる EMS 処理時間を求め、その時のサンプル (チオ硫酸ナトリウム水溶液中に懸濁した EMS 処理液) を 5000 倍に滅菌水で希釈し、その 200  $\mu$ l を YPD プレート上にまき 24℃ で培養して約 8000 個のコロニーを得た。各々のコロニーの菌を YPD プレート上に接種し、生じたハローの大きさを比較した。その結果ハローの直径が親株の 2 倍以上になった変異株 9 株を得、それ等のうち、最も大きなハローを生じた 1 株を



採取してサッカロマイセス セレビスエ popl株と命名した。

#### (4) popl によるアミラーゼの分泌

(a) pSAK031を単コピーで染色体上に組み込んだ場合

上記(3)で得られた popl株を、2%のグルコースを含むYPD培地を用いて30℃で一週間培養し、培養液中に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性を後に述べる方法により定量した。なお比較のためにEMSによる処理前のYNN27/pSAK031/Sを上記と全く同様に培養して培養液中に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性を定量した。その結果は表1の通りであった。

(b) pSAK031の組み込みのない popl株に、外部からpMT56を導入した場合

上記(3)で得られた popl株からpSAK031の組み込みを除去するために、popl株を野性型株であるサッカロマイセス セレビスエ A192[Genetics, 118巻, 499~506頁(1988年)]とかけ合せ、生じた2倍体を孢子形成させ、四分子解析を行なって、pSAK031

なお比較のために、YNN27株にpMT56を上記と全く同様の方法により導入して培養し、培養液中に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性を定量した。その結果は表2の通りであった。

#### [アミラーゼの定量法]

培養液の0.5 mlを、1%澱粉を含む20 mMのリン酸緩衝液(pH 7.0)0.5 mlと混合して30℃に保持し、0分後、15分後及び30分後に、夫々0.2 mlの試料を採取する。各々の試料に0.5 mlのDNS溶液(0.5 mlのジニトロサリチル酸を50 mlの水に懸濁させ、さらに20 mlの2N-NaOH、30 gのロッシェル塩及び水を加えて100 mlとしたもの)を添加して5分間煮沸する。

冷却後、1.3 mlの水を加え、試料の525 nmにおける吸光度( $A_{525}$ )を測定する。15分酵素反応した試料の $A_{525}$ 値と、0分に採取した試料の $A_{525}$ 値との差を算出する。

一方、酵素反応液の代わりに、グルコースを用いて検定線求めておき、試料の測定値からグルコース量を求める。分泌アミラーゼの1単位(unit)

の組み込みのない popl株(popl $\Delta$  pSAK031/S)をた。

この popl $\Delta$  pSAK031/S株にpMT56を以下の方法により導入した。

即ち、popl $\Delta$  pSAK031/S株をYPD培地で対数増殖期の中期まで培養し、1 Mの酢酸リチウム水溶液で1回洗浄した後に細胞数を測定し、 $1 \times 10^7$ 細胞/12  $\mu$ lになるように1 Mの酢酸リチウム水溶液を加えた。その12  $\mu$ l( $1 \times 10^7$ 細胞)を採取してエッペンドルフチューブに移し、これに2  $\mu$ gのpMT56及び45  $\mu$ lの50%のポリエチレングリコール水溶液を添加混合して30℃で45分間保持し、次いで42℃で5分間熱処理した後、滅菌水で洗浄した。

このように処理した細胞を100  $\mu$ lに懸濁して、CSM培地からトリプトファンを除去したプレート上にまき、30℃で3日間培養し、プレート上に成育したいくつかのコロニーを単離し、2%のグルコースを含むYPD培地を用いて30℃で一週間培養し、培養液中に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性を後に述べる方法により定量した。

は、1  $\mu$ gのグルコースを1分間に生成する量として示される。

表 1

菌 株	$\alpha$ -アミラーゼ活性 (units/ml 培養液)
popl株	1.61
YNN27/pSAK031/S	0.27

表 2

菌 株	$\alpha$ -アミラーゼ活性 (units/ml 培養液)
popl $\Delta$ pSAK031/Sに pMT56を導入	7.8
YNN27にpMT56を導入	2.0





(発明の効果)

本発明のサッカロマイセス セレビスイエ popI 株は、蛋白質分泌能を有しない周知のサッカロマイセス セレビスイエ YNN27 の変異株であり、蛋白質を高い効率で分泌する。それ故、これを宿主として、遺伝子組換え技術により有用な異種蛋白質を商業的に生産する場合に極めて有用である。

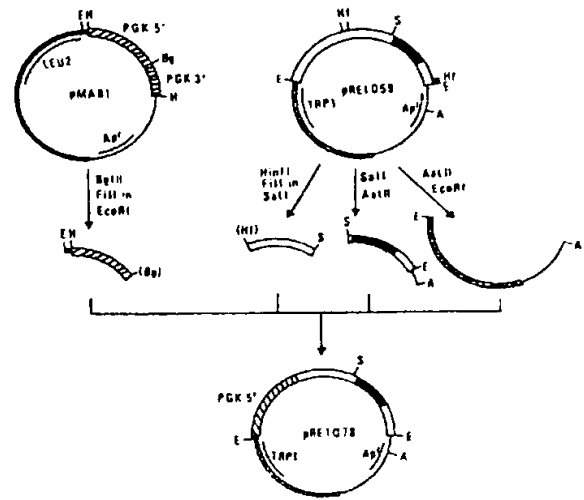
4 図面の簡単な説明

第 1 図及び第 2 図は、夫々プラスミド pRE1078 及び pSAK031 の構成ルートを示す模式図である。

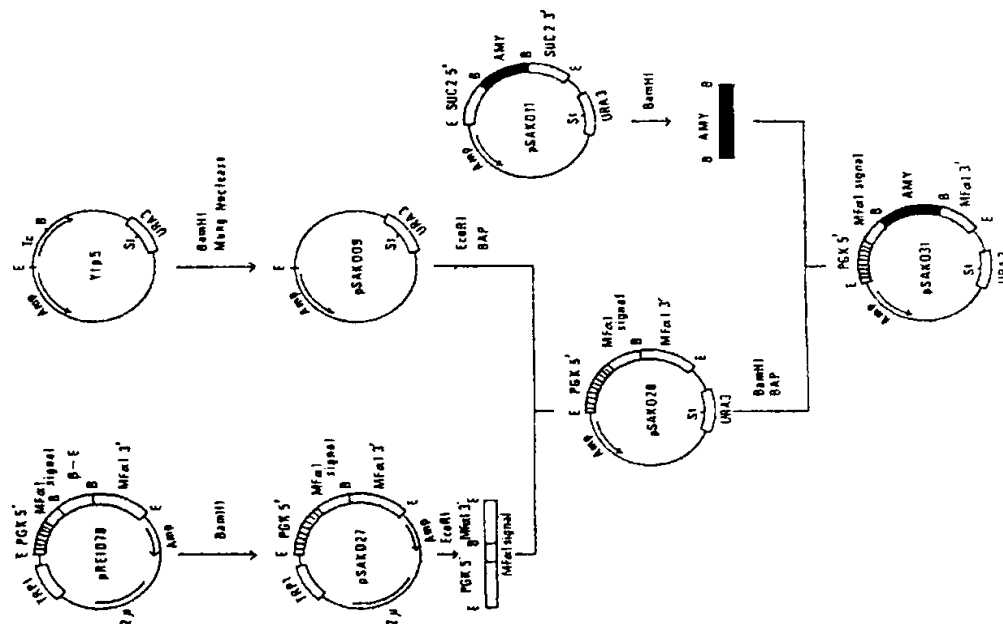
図中の記号 A は AatII を、B は BamHI を、Bg は BglII を、E は EcoRI を、H は HindIII を、Hf は HinfI を、M は MluI を、S は SalI を、St は StuI を夫々示す。

出願人 工業技術院長 飯 塚 幸 三

第 1 図



第 2 図





**(54) REACTION BED FOR IMMOBILIZED ENZYME**

(11) 2-156879 (A) (43) 15.6.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-310861 (22) 8.12.1988  
 (71) CHISSO CORP (72) MICHINORI KAWANO(1)  
 (51) Int. Cl. C12M1/40, C12N11/02

**PURPOSE:** To obtain the title reaction bed consisting of a fiber capable of immobilizing an enzyme and thermally adhesive composite fiber, stabilized in form by thermally bonding contact point of each fiber with an adhesive component of the thermally adhesive composite fiber, capable of enduring passing-through resistance and having small deformation and large effective area.

**CONSTITUTION:** A fiber blending web containing a fibrous carrier consisting of a cellulose fiber, etc., as a fiber capable of immobilizing an enzyme and sheath-core type thermally adhesive composite fiber, in which sheath component is polyethylene and core component is polypropylene is heat-treated with a suction dried at 140°C for 1min to provide the nonwoven fabric-like reaction bed for immobilized enzyme having contact point of each fiber thermally bonded with an adhesive component of thermally adhesive composite fiber and stabilized in form. Furthermore, the reaction bed for immobilized enzyme can be obtained by immobilizing the enzyme to a fibrous carrier constituting the reaction bed and capable of immobilizing the enzyme by a physical absorption method, ionic bond method and covalent bond method.

**(54) SACCHAROMYCES CEREVICIAE POP1**

(11) 2-156880 (A) (43) 15.6.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-311943 (22) 12.12.1988  
 (71) AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (72) AKIRA SAKAI(2)  
 (51) Int. Cl. C12N1/19, C12N15/31, (C12N1/19, C12R1/865)

**NEW MATERIAL:** *Saccharomyces cerevisiae* POP1 (FERM 10417) which is a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 and excretes protein in a high degree.

**USE:** It is useful as a host which can excrete the protein in a high degree, when different kinds of proteins are produced through a gene recombination technique.

**PREPARATION:** At first, PGK gene promoter, secretion signal of  $\alpha$ -factor of yeast (MF  $\alpha$ 1) in a yeast, mouse  $\alpha$ -amylase gene and the terminator area of MF  $\alpha$ 1 gene are inserted into a known plasmid Ylp5 to prepare plasmid pSAKO 31. The straight chain DNA of the plasmid is inserted into *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 chromosome and treated with ethyl methanesulfonate to induce mutation.

**(54) SACCHAROMYCES CEREVICIAE POP2**

(11) 2-156881 (A) (43) 15.6.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-311944 (22) 12.12.1988  
 (71) AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (72) AKIRA SAKAI(2)  
 (51) Int. Cl. C12N1/19, C12N15/31, (C12N1/19, C12R1/865)

**NEW MATERIAL:** *Saccharomyces cerevisiae* POP2 (FERM 10418) which is a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 and excretes protein in a high degree.

**USE:** It is useful as a host which can excrete the protein in a high degree, when different kinds of proteins are produced through a gene recombination technique.

**PREPARATION:** At first, PGK gene promoter, secretion signal of  $\alpha$ -factor of yeast (MF  $\alpha$ 1) in a yeast, mouse  $\alpha$ -amylase gene and the terminator area of MF  $\alpha$ 1 gene are inserted into a known plasmid Ylp5 to prepare plasmid pSAKO 31. The straight chain DNA of the plasmid is inserted into *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 chromosome and treated with ethyl methanesulfonate to induce mutation.



## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-156881

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup> 職別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成2年(1990)6月15日  
 C 12 N 1/19 7421-4B  
 15/31  
 //(C 12 N 1/19  
 C 12 R 1:865) 8717-4B C 12 N 15/00 A  
 審査請求 有 請求項の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 サツカロマイセスセレビスイエ pop 2

⑯ 特 願 昭63-311944

⑰ 出 願 昭63(1988)12月12日

⑱ 発 明 者 酒 井 明 東京都町田市成瀬2丁目9番4号13-306  
 ⑲ 発 明 者 菱 沼 文 男 神奈川県川崎市麻生区栗平2丁目14番28号  
 ⑳ 発 明 者 清 水 由 紀 東京都町田市金森681番地1  
 ㉑ 出 願 人 工 業 技 術 院 長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

## 明 細 書

## 1 発明の名称

サツカロマイセス セレビスイエ pop2

## 2 特許請求の範囲

(1) サツカロマイセス セレビスイエ YNN27 の変異株であって、蛋白質を高度に分泌する微生物第10418号として寄託されたサツカロマイセス セレビスイエ pop2。

## 3 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明は、蛋白質を高度に分泌する新規な酵母サツカロマイセス セレビスイエ pop2に関する。

## (従来の技術と問題点)

酵母は、細胞の構造や機能が高等生物の特徴を備え、また食品、医薬品、飼料等の原料として人間の日常生活と深い係わり合いを持つ有用な微生物であり、遺伝子工学における宿主としての開発が期待されている。

しかし、通常酵母を宿主として遺伝子組換え技術により有用物質(異種蛋白質)を生産する場合、

酵母の細胞表面は細胞膜の外側に強固な細胞壁を有するため、生産された異種蛋白質の精製が困難な場合が多く、精製を簡略化するために生産物を菌体外に分泌させる試みが種々提案されているが、いまだ満足し得る結果は得られていない。

## (問題点を解決するための手段)

本発明者等は、酵母サツカロマイセス セレビスイエ(*Saccharomyces cerevisiae*)を宿主として遺伝子組換え技術により異種蛋白質を生産する際、生産された物質を効率よく分泌させることのできる宿主を得ることを目的として研究の結果、それ自体は蛋白質を分泌する能力が小さい周知の酵母サツカロマイセス セレビスイエ YNN27 の染色体に、ある種の組み込み型プラスミドを導入し、次いでエチルメタンスルホネートで処理することによって得られた突然変異体が、特定培地中で異種蛋白質を高度に分泌することを確認し本発明を達成した。

即ち、本発明の要旨は、サツカロマイセス セレビスイエ YNN27 の変異株であって、蛋白質を高度



に分泌する酵母菌第10418号として寄託されたサッカロマイセス セレビスエ pop2に存する。

本発明を詳細に説明するに、本発明の酵母サッカロマイセス セレビスエ pop2は、微生物菌第10418号(FERM P-10418)として寄託されており、酵母サッカロマイセス セレビスエ YNN27[*Journal of Molecular Biology*, 158巻, 157~179頁(1982年)][微生物菌第10419号(FERM P-10419)]を親株とし、以下に述べる方法により調製される変異株である。

(1) [サッカロマイセス セレビスエ YNN27染色体へのプラスミド pSAK031の直鎖状DNAの挿入]

まずサッカロマイセス セレビスエ YNN27に、横記する方法によって調製されたプラスミド pSAK031の直鎖状DNAを導入して、これを YNN27の染色体に挿入する。

ここに使用されるプラスミド pSAK031は、第2図に示すように、サッカロマイセス セレビスエのホスホグリセレートキナーゼ遺伝子として知られているPGK遺伝子[Nucleic Acids Research, 10

ターミネーター配列並びにTRP1、2 $\mu$ m及びpBR322のoriとアンピシリン耐性遺伝子(Ap<sup>r</sup>)を有し、かつリーダー配列とターミネーター配列との間にヒト $\beta$ -エンドルフィン遺伝子が挿入されている公知のプラスミド pRE1059を使用し、そのプロモーター配列をホスホグリセレートキナーゼ(PGK)のプロモーター配列で置換したプラスミド pRE1078を作製する。

即ち、PGKのプロモーター配列とターミネーター配列を含む公知のプラスミド pMA91[*Gene*, 24巻, 1~14頁(1983年)]をBglIIで切断し、DNAポリメラーゼIで平滑末端とした後、EcoRIで切断してPGKのプロモーター配列を含む1.5 kbのEcoRI-(BglII)断片(I)を単離する。

一方、前記のpRE1059をHinfIで切断し、末端を充填した後、SalIで切断してMF $\alpha$ 1の5'非翻訳領域とリーダー配列を含む337 bpの断片(II)を単離する。また、pRE1059のヒト $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を含むSalI-AstII断片(III)と、TRP1、2 $\mu$ m及びpBR322のori並びにAp<sup>r</sup>領域を含むEcoRI

断片, 23号, 7791~7808頁(1983年)]のプロモーター、酵母の性接合因子である $\alpha$ 因子(MF $\alpha$ 1)の分泌シグナル、マウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子及びMF $\alpha$ 1遺伝子のターミネーター領域を、周知のプラスミド Yip5に挿入することによって得られるものであり、例えば以下の工程により調製される。

[プラスミド pSAK031の調製]

(a) プラスミド pSAK009の調製

周知のプラスミド Yip5[*Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 76巻, 1035~1039頁(1979年)]をBamHIで切断し、Mung beanヌクレアーゼで末端を平滑化してBamHI切断部位を破壊した後、自己連結させてプラスミド pSAK009を調製する(第2図参照)。

(b) プラスミド pRE1078(7.5 kb)の作製

特開昭63-133987号公報及び[*Molecular and Cellular Biology*, 7巻, 3185~3193頁(1987年)]に記載されている方法で作製した、サッカロマイセス セレビスエの $\alpha$ フェロモン遺伝子MF $\alpha$ 1のプロモーター配列、リーダー(分泌シグナル)配列、タ

ターミネーター配列(IV)とを夫々の制限酵素で切断して得る。上記で得られる(1)~(IV)を同時に結合することによりpRE1078(7.5 kb)を作製する(第1図参照)。

(c) プラスミド pSAK028の調製

pRE1078をBamHIで切断し、再結合させることにより、ヒト $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を除去したpSAK027を調製する。このpSAK027をEcoRIで切断して、PGKのプロモーター、MF $\alpha$ 1の分泌シグナル配列及びMF $\alpha$ 1のターミネーター配列を含む2.1 kbのDNA断片を単離する。このDNA断片を、前記のpSAK009をEcoRIで切断して得られた5.5 kbのDNA断片と結合させてpSAK028を調製する(第2図参照)。

(d) プラスミド pSAK031の調製

マウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子(それ自身のシグナル配列を除いたもの)を含む周知のプラスミド pSAK011[*Genetics*, 119巻, 499~508頁(1988年)]をBamHIで切断し、得られる約1.5 kbのマウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子断片を、前記プラスミド

the 'information' and 'communication' fields. The 'information' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'communication' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information science' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information studies' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information science and communication' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information science and communication studies' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information science and communication studies' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information science and communication studies' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information science and communication studies' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)

The 'information science and communication studies' field is defined as:

...the study of the nature, creation, organisation, storage, retrieval, dissemination and use of information and communication, and the social and cultural contexts in which these activities take place. (p. 1)



pSAK028のBamHI部位に連結させ、プロモーターとアミラーゼ遺伝子が同方向で結合したものを選択しプラスミドpSAK031とする(第2図参照)。

#### [YNN27へのpSAK031の導入]

以上のようにして得られたプラスミドpSAK031をStuIで切断して直鎖状DNAとし、これをYNN27へ導入して、YNN27の第V番の染色体に、pSAK031の直鎖状DNAが1コピー組み込まれた菌株(以下YNN27/pSAK031/Sという)を得る。

pSAK031の直鎖状DNAのYNN27への導入は、それ自体周知の方法によって実施される。例えば、特開昭59-28478号公報に記載されている方法に従い、YNN27を適当な培地、例えばYPD培地を用いて培養後集菌し、緩衝液に懸濁し、これに例えばリチウム、ルビジウム又はセシウム等の金属イオンを加えた後、前記のpSAK031をStuIで切断した直鎖状DNA及びポリエチレングリコール水溶液を添加し、次いで40℃程度で短時間熱処理し、滅菌水で洗浄する。この方法は、菌体のプロトプラスト化処理を要しないので酵母へのDNAの導入法として特に

好ましい。

このように処理した細胞を滅菌水に懸濁して、CSM培地からウラシルを除去したプレート上にまき培養する。プレート上に成育したいくつかのコロニーをYPD培地で培養した後、DNAを抽出し、得られたDNAをサザンハイブリダイゼーション法により解析し、pSAK031の直鎖状DNAが1コピー組み込まれたYNN27/pSAK031/Sを選択する。

#### (2)[エチルメタンスルホネートによる処理]

以上のようにして調製したYNN27/pSAK031/Sは、次いで酵母菌体の突然変異誘発剤として知られているエチルメタンスルホネート(以下EMSという)を用いて[Methods in yeast genetics, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1978年)]に記載されている方法により処理してサッカロマイセスセレビシエ pop2株を調製する。

即ち、前記で得られたYNN27/pSAK031/SをYPD培地で培養して緩衝液で洗浄後、所定の細胞濃度に調製し、これに所定量のEMSを加えて処理し、

EMS処理菌を希釈してYPD培地上で培養し、生成する約8000個のコロニーの菌をYPDプレート上に接種し、生ずるハローの大きさを比較し、ハローの直径が親株の2倍以上になった変異株を採取して37℃で2日間培養する。その結果、生育し得ない1株を選択してサッカロマイセスセレビシエ pop2株と命名する。

以上のようにして得られた本発明のpop2株は、後記実施例に示すように、アミラーゼを高い効率で分泌する。なお、EMSによる処理前のYNN27/pSAK031/Sもアミラーゼを分泌するが、pop2株のアミラーゼ分泌量は、YNN27/pSAK031/Sのアミラーゼ分泌量を遙かに凌駕する。

また、本発明のpop2株に他の異種蛋白質遺伝子を含むプラスミドを導入すれば、その異種蛋白質分泌させることができる。

例えば本発明のpop2株に、ヒトの $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を含む前記のプラスミドpRE1078を導入すれば、高い効率で $\beta$ -エンドルフィンの分泌が認められる。

pop2株へのpRE1078の導入は、前記YNN27株へのpSAK031の導入と同様な方法により行ない、CSM培地からトリプトファンを除去したプレート上にまいて培養し、このプレート上に成育したコロニーを単離する。こうして得られる、pRE1078を導入したpop2株は、後記実施例に示すように、高い効率で $\beta$ -エンドルフィンを分泌する。

なお、前記YNN27/pSAK031/Sに、上記と同様の方法でpRE1078を導入した場合にも $\beta$ -エンドルフィンの分泌は認められるが、pop2株にpRE1078を導入した場合の $\beta$ -エンドルフィンの分泌量は、その約5倍に達する。

#### 実施例)

以下本発明を実施例について更に詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限りこれ等の実施例に限定されるものではない。

なお、以下の実施例における操作は、特に記載する場合を除き、次のI~Vの方法によった。

#### I[制限酵素によるDNAの切断と回収]

制限酵素による切断用緩衝液は、下記3種類を

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

用い(1)~(3)の使い分けは Advanced Bacterial Genetics(1981年)(Cold spring Harbor, New York)

に従った。また切断条件は、2単位/ $\mu$ g DNAの制限酵素を用い、37℃または65℃で30分間処理する。

次いで、TE緩衝液(10 mMのトリス塩酸 pH 8.0及び1 mMのEDTAからなる)で飽和したフェノールで1回抽出し、エーテルでフェノールを除き2倍容のエタノールを加えて-20℃で30分間放置した後、遠心分離してDNAを回収する。

#### (1)低塩濃度緩衝液

10 mMのトリス塩酸(pH 7.4)、10 mMの硫酸マグネシウム及び1 mMのジチオスレイトールからなる。

#### (2)中塩濃度緩衝液

50 mMのNaCl、10 mMのトリス塩酸(pH 7.4)、10 mMの硫酸マグネシウム及び1 mMのジチオスレイトールからなる。

#### (3)高塩濃度緩衝液

100 mMのNaCl、50 mMのトリス塩酸(pH 7.4)及び10 mMの硫酸マグネシウムからなる。

(pH 4.6)、50 mMのNaCl及び1 mlのZnCl<sub>2</sub>からなる緩衝液100  $\mu$ lに溶解し、これに1  $\mu$ l(2units/ $\mu$ l)のMung beanヌクレアーゼを加えて37℃で10分間処理した後、2  $\mu$ lの25% SDS溶液、10  $\mu$ lの0.5 M トリス塩酸緩衝液(pH 9.5)及び10  $\mu$ lの8 M LiClを加加する。

次いでこれに150  $\mu$ lのフェノール及びクロホルム混合液(1:1)を加えて抽出処理し、水層を採取して10  $\mu$ lの3 M酢酸ナトリウムと200  $\mu$ lのエタノールを加え、-20℃に冷却し、遠心分離して沈殿したDNAを回収する。

#### IV[T4 DNAリガーゼによる連結]

連結する2個のDNA断片は、1  $\mu$ g/10  $\mu$ lになるように連結用緩衝液[66 mMのトリス塩酸(pH 7.5)、6.6 mMの塩化マグネシウム、10 mMのジチオスレイトールからなる]に溶解し65℃で10分間処理した後、4℃で66  $\mu$ MのATP(アデノシントリフォスフェート)を加え、更にT4 DNAリガーゼを、粘着末端の場合は0.1単位/ $\mu$ g DNA、また平滑末端の場合は1単位/ $\mu$ g DNAになるように加えて4℃で

II[DNA断片の仔牛小腸アルカリリンホスファターゼ(CIAP)による処理]

リガーゼ反応によるプラスミドDNAの自己連結を阻止するため、リガーゼ反応に先だって、プラスミドDNAの制限酵素による切断断片をCIAPで処理する。

制限酵素で切断したプラスミドDNA(10 p mol 5'末端)を50  $\mu$ lのCIAP緩衝液[50 mMのトリス塩酸(pH 8.0)、1 mMの塩化マグネシウム、0.1 mMの塩化亜鉛及び1 mMのスベルミジンからなる]に溶解し、1 p mol末端当たり、0.01単位のCIAPを加え37℃で30分間反応後、10  $\mu$ lの0.1 M トリス塩酸(pH 8.0)、1 M NaCl、10 mM EDTA、5  $\mu$ lの10% SDS、40  $\mu$ lの水を加え、65℃で15分間保持する。冷却後TE緩衝液で飽和したフェノールで抽出処理し、エーテルでフェノールを除去し、エタノール沈澱によりプラスミドDNAを回収する。

III[Mung beanヌクレアーゼによるDNA粘着末端の除去]

粘着末端を持つDNAを、30 mMの酢酸ナトリウム

18時間反応させた後、65℃で10分間処理する。

#### V[酵母の形質転換(KU法)]

酵母サッカロマイセス・セレビシエを10 mlのYEFD培地中で30℃で一週間培養し、集菌して一回TE緩衝液で洗浄した後、同緩衝液に懸濁し、細胞数が $2 \times 10^6$  cells/mlとなるようにする。

この懸濁液500  $\mu$ lに同量の0.2M 酢酸リチウム(pH 7.5)を加え30℃で1時間保持した後、100  $\mu$ lの試験管に分注し、0℃でこれにDNAを加え0℃で30分間混合する。100  $\mu$ lの70%ポリエチレングリコール4000を含むTE緩衝液を加え、よく混合した後30℃で1時間、次いで42℃で5分間保持し、遠心分離して集菌し、滅菌水で洗浄する。

これを500  $\mu$ lの滅菌水に懸濁し、100  $\mu$ lの菌を選抜培地に接種し、30℃で3~4日間培養して形質転換株を得る。

#### 実施例 1

##### (1)プラスミドpSAK031の調製

##### (a)プラスミドpSAK008の調製

プラスミドYip5をBamHIで切断し、Mung bean



ヌクレアーゼで末端を平滑化してBamHI切断部位を破壊した後、T4 DNAリガーゼを用いて自己連結させてプラスミドpSAK009を調製した(第2図)。

#### (b) プラスミドpRE1078(7.5 kb)の作製

PGKのプロモーター配列とターミネーター配列を含むプラスミドpMA91をBglIIで切断し、DNAポリメラーゼIで平滑末端とした後、EcoRIで切断してPGKのプロモーター配列を含む1.5 kbのEcoRI-(BglII)断片(I)を単離した。一方、pRE1059をHinfIで切断し、末端を充填した後、SalIで切断してHf $\alpha$ 1の5'非翻訳領域とリーダー配列を含む337 bpの断片(II)を単離した。またpRE1059の $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を含むSalI-AatII断片(III)と、TRP1、2 $\mu$ m及びpBR322のori、Ap<sup>r</sup>を含むEcoRI-AatII断片(IV)とを、夫々の制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動により分離し、目的のバンドを溶出することにより得た。上記で得た(I)~(IV)の断片を同時にT4 DNAリガーゼで結合してpRE1078(7.5 kb)を作製した(第1図)。

#### プラスミドpSAK031の導入

pSAK031をStuIで切断して直鎖状DNAとした。

YNN27をYPD培地で対数増殖期の中期まで培養し、1 Mの酢酸リチウム水溶液で1回洗浄した後、細胞数を測定し、 $1 \times 10^7$ 細胞/12 $\mu$ lになるように1 Mの酢酸リチウム水溶液を加えた。

その12 $\mu$ l( $1 \times 10^7$ 細胞)を採取してエッペンドルフチューブに移し、これに2 $\mu$ gの前記pSAK031の直鎖状DNA及び45 $\mu$ lの50%のポリエチレングリコール水溶液を添加混合して30℃で45分間保持し、次いで42℃で5分間熱処理した後、滅菌水で洗浄した。

このように処理した細胞を100 $\mu$ lの滅菌水に懸濁して、CSM培地からウラシルを除去したプレート上にまき、30℃で3日間培養した。プレート上に成育したいくつかのコロニーを5 mlのYPD培地で一夜間培養した後、DNAを抽出し、得られたDNAをサザンハイブリダイゼーション法により解析して、pSAK031の直鎖状DNAが1コピー組み込まれたYNN27/pSAK031/Sを選択した。

#### (c) プラスミドpSAK028の調製

上記(b)で得たpRE1078をBamHIで切断し、T4 DNAリガーゼで再結合させることにより、pRE1078からヒト $\beta$ -エンドルフィン遺伝子を除去したpSAK027を得た。このpSAK027をEcoRIで切断して、PGKのプロモーター、Hf $\alpha$ 1の分泌シグナル配列及びHf $\alpha$ 1のターミネーター配列を含む2.1 kbのDNA断片を単離した。このDNA断片を、前記(a)で得たpSAK009をEcoRIで切断して得られた5.5 kbのDNA断片と結合させてpSAK028を調製した(第2図)。

#### (d) プラスミドpSAK031の調製

マウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子(それ自身のシグナル配列を除いたもの)を含むプラスミドpSAK011をBamHIで切断し、得られた約1.5 kbのマウスの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子断片を、前記(c)で得たpSAK028のBamHI部位に、T4 DNAリガーゼを用いて連結させ、プロモーターとアミラーゼ遺伝子が同方向で結合したものを選別してプラスミドpSAK031を得た(第2図)。

#### (2) サッカロマイセス セレビスエ YNN27へのブラ

#### (3) YNN27/pSAK031/SのEMSによる処理

前記(2)で得られたYNN27/pSAK031/SをYPD培地で一夜間培養し、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)で洗浄後、 $5 \times 10^8$ 細胞/mlの濃度になるように0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液を加え、更に30 $\mu$ lのEMSを添加して30℃に保持し、5分間隔で100 $\mu$ lずつ採り、4 mlの5%チオ硫酸ナトリウム水溶液中に加えてEMSを中和した。

5分間隔で採取したEMS処理菌を夫々10000倍に希釈し、その200 $\mu$ lをYPD培地(プレート)上にまき、24℃で2日間培養した。この間、チオ硫酸ナトリウム水溶液中に懸濁している細胞はアルミホイルで遮光して8℃に保存した。2日後にYPDプレート上に出現したコロニーの数を計測して生存率を決定した。生存率が40~50%になるEMS処理時間を求め、その時のサンプル(チオ硫酸ナトリウム水溶液中に懸濁したEMS処理菌)を5000倍に滅菌水で希釈し、その200 $\mu$ lをYPDプレートにまき24℃で培養して、生成する約8000個のコロニーの菌を得た。各々の菌をYPDプレート上に植



表 1

菌 株	$\alpha$ -アミラーゼ活性 (units/ml 培養液)
pop2株	1.50
YNN27/pSAK031/S	0.27

菌し、生ずるハローの大きさを比較し、生じたハローの大きさを比較した。その結果、ハローの直径が親株の2倍以上になった変異株9株を採取して、37℃で2日間培養した。その結果、生育しなかったサッカロマイセス セレビスイエ pop2株を選抜採取した。

#### (4)pop2株によるアミラーゼの分泌

上記(3)で得られたpop2株を、2%のグルコースを含むYPD培地を用いて30℃で二日間培養し、培養液中に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性を後に述べる方法により定量した。なお比較のためにEMS処理前のYNN27/pSAK031/Sを上記と全く同様に培養して培養液中に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ活性を定量した。その結果は表1の通りであった。

#### (5)pop2株へのpRE1078の導入

pop2株をYPD培地で対数増殖期の中期まで培養し、1Mの酢酸リチウム水溶液で1回洗浄した後、細胞数を測定し、 $1 \times 10^7$ 細胞/12 $\mu$ lになるように1Mの酢酸リチウム水溶液を加えた。その12 $\mu$ l( $1 \times 10^7$ 細胞)を採取してエッペンドルフチューブに移し、これに2 $\mu$ gのpRE1078及び45 $\mu$ lの50%のポリエチレングリコール水溶液を添加混合して23℃で45分間保持し、次いで37℃で5分間熱処理した後、滅菌水で洗浄した。このように処理した細胞を100 $\mu$ lに懸濁して、CSH培地からトリ

プトファンを除去したプレート上にまき、30℃で3日間培養し、プレート上に成育したいくつかのコロニーを単離した。

#### (6)pRE1078を導入したpop2株による $\beta$ -エンドルフィンの分泌

上記(5)で得たpRE1078を導入したpop2株を、2%のグルコースを含むCSH培地からトリプトファンを除去した培地を用いて、24℃で二日間培養し、培養液上澄中に含まれる $\beta$ -エンドルフィンの分泌量を測定した。

なお $\beta$ -エンドルフィンの分泌量の測定は、 $\beta$ -エンドルフィン[RIA]キット New England 社、カタログ番号 NEK-003を使用し、該カタログ記載の方法に従い、ラジオイムノアッセイを行なった。

捕獲のために、前記YNN27/pSAK031/Sに、上記と同様の方法によりpRE1078を導入した菌株を培養して、同様の方法により $\beta$ -エンドルフィンの分泌量を測定した。その結果は表2の通りであった。

表 2

菌 株	$\beta$ -エンドルフィンの分泌量(ng/ml)
pop2株にpRE1078を導入した菌株	1900
YNN27/pSAK031/SにpRE1078を導入した菌株	480

#### (発明の効果)

本発明のサッカロマイセス セレビスイエpop2株は、蛋白質分泌能を有しない周知のサッカロマイセス セレビスイエYNN27の変異株であり、蛋白質を高い効率で分泌する。それ故、これを宿主として、遺伝子組換え技術により有用な異種蛋白質を商業的に生産する場合に極めて有用である。

#### 4 図面の簡単な説明



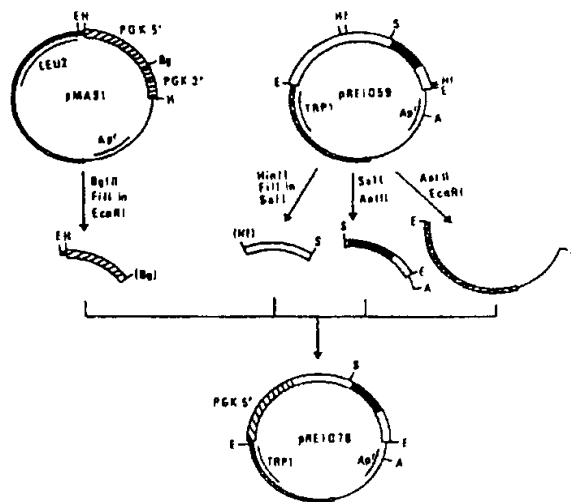


第1図及び第2図は、夫々プラスミドpRE1078及びpSAK031の構成ルートを示す模式図である。

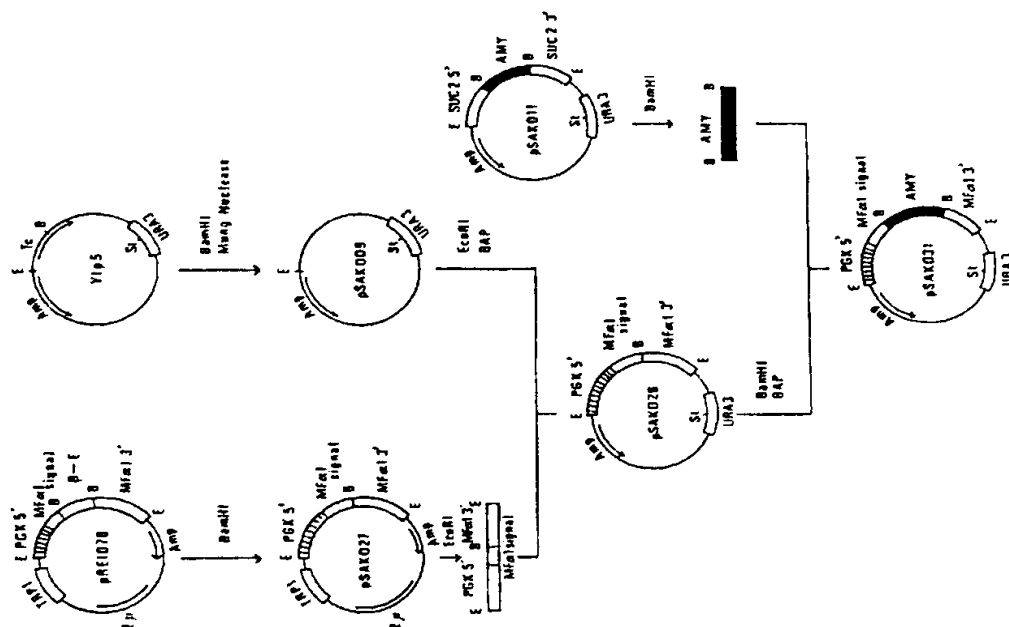
図中の記号 AはAatIIを、BはBamHIを、BgはBglIIを、EはEcoRIを、HはHindIIIを、HfはHinfIを、HはHluIを、SはSalIを、StはStuIを夫々示す。

出願人 工業技術院長 飯 塚 幸 三

第 1 図



第 2 図





**(54) REACTION BED FOR IMMOBILIZED ENZYME**

(11) 2-156879 (A) (43) 15.6.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-310861 (22) 8.12.1988  
 (71) CHISSO CORP (72) MICHINORI KAWANO(1)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup>. C12M1/40, C12N11/02

**PURPOSE:** To obtain the title reaction bed consisting of a fiber capable of immobilizing an enzyme and thermally adhesive composite fiber, stabilized in form by thermally bonding contact point of each fiber with an adhesive component of the thermally adhesive composite fiber, capable of enduring passing-through resistance and having small deformation and large effective area.

**CONSTITUTION:** A fiber blending web containing a fibrous carrier consisting of a cellulose fiber, etc., as a fiber capable of immobilizing an enzyme and sheath-core type thermally adhesive composite fiber, in which sheath component is polyethylene and core component is polypropylene is heat-treated with a suction dried at 140°C for 1min to provide the nonwoven fabric-like reaction bed for immobilized enzyme having contact point of each fiber thermally bonded with an adhesive component of thermally adhesion composite fiber and stabilized in form. Furthermore, the reaction bed for immobilized enzyme can be obtained by immobilizing the enzyme to a fibrous carrier constituting the reaction bed and capable of immobilizing the enzyme by a physical absorption method, ionic bond method and covalent bond method.

**(54) SACCHAROMYCES CEREVICIAE POP1**

(11) 2-156880 (A) (43) 15.6.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-311943 (22) 12.12.1988  
 (71) AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (72) AKIRA SAKAI(2)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup>. C12N1/19, C12N15/31// (C12N1/19, C12R1/865)

**NEW MATERIAL:** *Saccharomyces cerevisiae* POP1 (FERM 10417) which is a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 and excretes protein in a high degree.

**USE:** It is useful as a host which can excrete the protein in a high degree, when different kinds of proteins are produced through a gene recombination technique.

**PREPARATION:** At first, PGK gene promoter, secretion signal of  $\alpha$ -factor of yeast (MF  $\alpha$ 1) in a yeast, mouse  $\alpha$ -amylase gene and the terminator area of MF  $\alpha$ 1 gene are inserted into a know plasmid Ylp5 to prepare plasmid pSAKO 31. The straight chain DNA of the plasmid is inserted into *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 chromosome and treated with ethyl methanesulfonate to induce mutation.

**(54) SACCHAROMYCES CEREVICIAE POP2**

(11) 2-156881 (A) (43) 15.6.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-311944 (22) 12.12.1988  
 (71) AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (72) AKIRA SAKAI(2)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup>. C12N1/19, C12N15/31// (C12N1/19, C12R1/865)

**NEW MATERIAL:** *Saccharomyces cerevisiae* POP2 (FERM 10418) which is a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 and excretes protein in a high degree.

**USE:** It is useful as a host which can excrete the protein in a high degree, when different kinds of proteins are produced through a gene recombination technique.

**PREPARATION:** At first, PGK gene promoter, secretion signal of  $\alpha$ -factor of yeast (MF  $\alpha$ 1) in a yeast, mouse  $\alpha$ -amylase gene and the terminator area of MF  $\alpha$ 1 gene are inserted into a known plasmid Ylp5 to prepare plasmid pSAKO 31. The straight chain DNA of the plasmid is inserted into *Saccharomyces cerevisiae* YNN27 chromosome and treated with ethyl methanesulfonate to induce mutation.



# 酵母による異種蛋白質の分泌生産

菱沼文男\*

大腸菌と酵母は、微生物学の教科書においてはまず二大チャンピオンといったところであろう。しかし、遺伝子組換えなどバイオテクノロジーの先端技術と結びつくとき、前者に比べて酵母菌は、後れをとっているかに見える。ここでは有用蛋白質の生産を目指して、酵母利用の可能性を基礎的問題から探っている。

1978年に Hinnen ら<sup>1)</sup>によって酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の形質転換法が確立されて以来、その内在するプラズミド (2  $\mu$ m DNA) や染色体 DNA の複製開始点 (ARS: Autonomously Replicating Sequences) を用いたベクターが相次いで開発され、酵母の遺伝子操作研究は急速に進展した。酵母を DNA 組換え研究の宿主として用いることの意義はいろいろあるが、豊富な遺伝学的知見が蓄積していること、細胞の構造や機能、遺伝子の複製・転写・翻訳機構など多くの点で高等生物の特徴を備えており、高等生物の生命現象を解析するの上好適なモデルとなること、また食品・醸造・飼料・医薬品原料の有用な微生物として、工業的に利用されてきた歴史は古く、発酵工学および培養工学的知見も豊富であることなどを挙げることができる。

遺伝子組換えによる有用蛋白質の生産においては、当初から大腸菌が宿主として用いられてきた。大腸菌は分子生物学において最もよく用いられてきた菌であり、ベクターの開発をはじめとする方法論の蓄積は他の菌に比較優位のものである。すでに種々のサイトカイン、成長因子などが大腸菌で生産され、市販されているが、この大腸菌にもいくつかの欠点がある。その一つは、大腸菌に存在する  $\alpha$ -ガラクトサミンナーゼが人間に対して有害であるため、特に医薬品の場合その精製に十分な注意を要することがある。また、B型肝炎ウイルスの表面抗原蛋白 (HBsAg) や組織プラスミノーゲン活性化剤 (TPA) などでは活性のある蛋

白質が生産されないことや、ペプチドナルキリンのような分子量の小さな物質は、大腸菌内で分解されても分解され、それほとんど蓄積されないことも知られている。このような大腸菌の欠点を補うために、他の宿主の利用が試みられてきたが、その中でも有力な候補の一つとして酵母が注目されている。

実際、HBsAg では活性な蛋白質の生産に成功し、ワクチンとしてすでに商品化されている<sup>2)</sup>。しかし、酵母細胞は堅固な細胞壁を有しているために、細胞内に生産した蛋白質の精製に非常な力りを要するし、生産量にも限界がある。もし生産物を菌体外に分泌させれば、精製の容易さによる工業化プロセスの簡略化だけでなく、高効率生産、連続培養法の適用など、そのメリットはきわめて大きいと期待されている。このような工業利用だけでなく、機能のあまり知られていない蛋白質を、このように大規模に生産し、さらに蛋白質工学的手法と組合せることにより、蛋白質の構造と機能を明らかにしたり、蛋白質の改良にも応用することができ、その利用価値はいかに高いと思われる。本稿では、異種蛋白質生産に用いられる酵母の宿主・ベクター系についての解説とともに、その生産の現状および生産効率をあげるための各種試みについて紹介する。

## 酵母の発現ベクター

### 1. ベクターの種類

*S. cerevisiae* のベクターは、主として YEp、YRp、YCp、YIp の4つの型に分類される (図1)。YEp 型は *S. cerevisiae* の多くの菌に細胞当

Secretion of Foreign Proteins in Yeast

\* Fumio HISHINUMA, 三井化成生命科学研究所



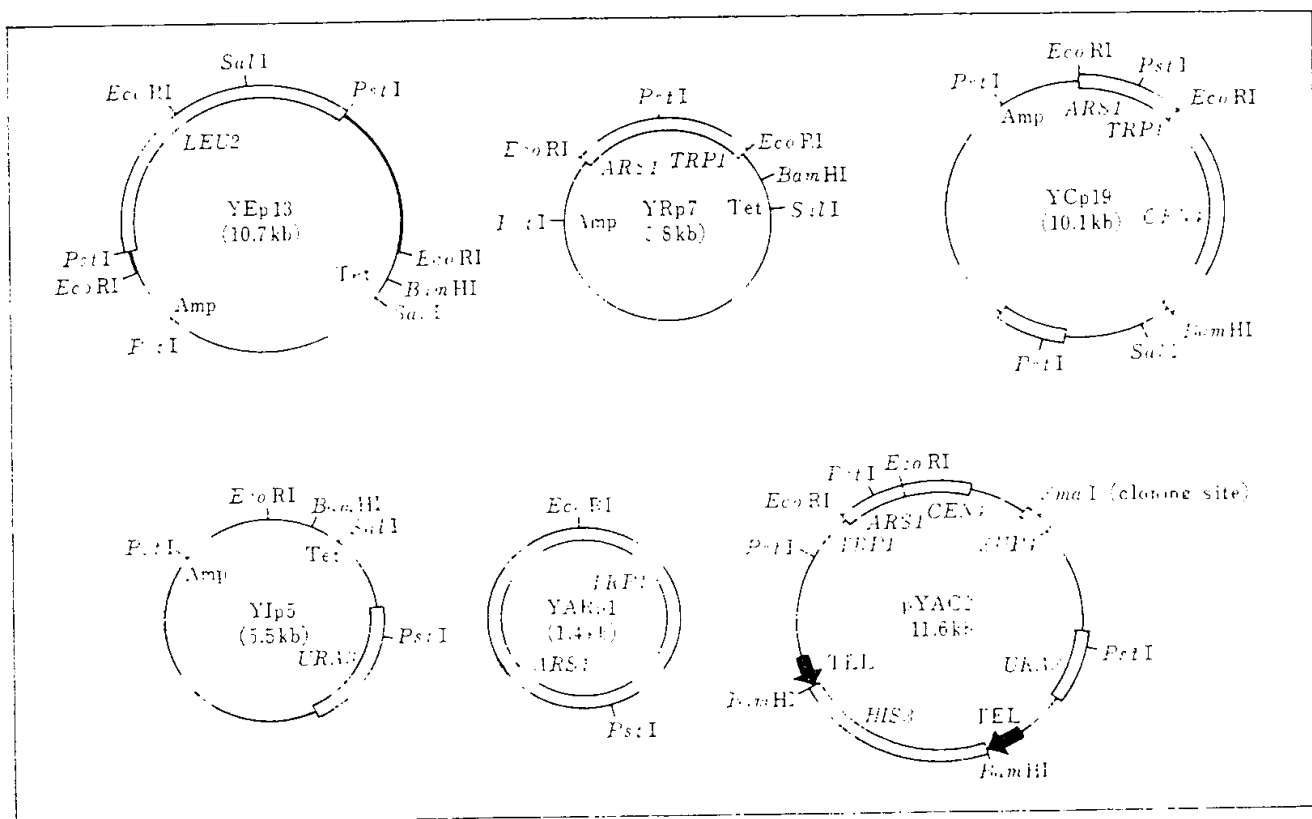


図 1 ■ 酵母ベクターの構造

---: pBR322 由来, —: 2 $\mu$ m DNA 由来, ==: 酵母運送子由来 →: オリガニン化された DNA の末端 (テール) 配列

り 25~100 コピー含まれる小型環状のプラスミド 2 $\mu$ m (6,318 bp) の複製に必要な領域 (*ORI*, *STB*) を含むプラスミドである。YEp プラスミドは細胞当たり平均 5~10 コピー含まれているといわれ<sup>(8)</sup>, ともに存在している 2 $\mu$ m プラスミドから *REP1*, *REP2* 蛋白質が供給されることにより安定に保持される<sup>(9)</sup>ので, 物質生産には最もよく利用されている。YRp 型は, 酵母染色体の約 35 kb 当たり 1 個存在する *ARS* を含むプラスミドである。その 1 つ YRp7 は, *TRP1* 遺伝子を含む 1.4 kb の *EcoRI* 断片が挿入されているが, *ARS* は *TRP1* 遺伝子の 3' 側 850 bp 中に存在し<sup>(10)</sup>, 他の *ARS* の解析結果から A T T T A T P T T T A T (P はプリン) から成る 11 bp の共通配列と考えられている<sup>(11)</sup>。YRp 型プラスミドは比較的不安定であるが, これにセントロメア (動原体) 配列を挿入して安定化したものが YCp 型である。したがって, 本プラスミドは 1~2 コピーしか存在しない。YIp 型は酵母の *ARS* 配列を含まないプラスミドであり, 相同的組換えにより染色体に伝送される

ことにより, 安定に保持される。

その他のベクターとしては, 前述の *TRP1* 遺伝子を含む 1.4 kb 断片を環状化した DNA (YARp1)<sup>(12)</sup> が コピー数 100~200 と非常に少なく, 酵母の DNA 断片を挿入したものは安定である<sup>(13)</sup>, しかし, 本プラスミドは大腸菌では複製できないため, DNA の調製など扱いにくい面がある。また最近, 数 kb もの長い DNA 断片をスクリーニングできる人工染色体ベクター pYAC2 (図 1) が開発された<sup>(14)</sup>。これは, *TRP1*, *ARS1*, *CEN4* の他に 2 例のセントロメア (染色体 DNA の末端) 配列を含むベクターであり, 高等生物遺伝子の解析には非常に有用であると思われる。

## 2. プロモーター

異種蛋白質生産のための発現ベクターの中には, 宿主内で効率よく機能するプロモーターの存在が必須である。酵母では解糖系の酵素群が全水溶性蛋白質の 30~65% を占め<sup>(15)</sup>, 少量に発現することが知られている。中でも 3-オキシグリセ





レートキナーゼ遺伝子 (*PGK*) やグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (*GLD*)、エノラーゼ (*ENO*)、トリオースリン酸酵素 (ツクラーゼ) (*TPI*)、アルコール脱水素酵素 (*ADH*) などの遺伝子のプロモーターはよく利用されている。その他、培養条件を変化させることにより発現の調節が可能なプロモーターとして、酸性ファスファターゼ (*PHO5*) やガラクトース代謝系の遺伝子 (*GAL1*, *GAL10*, *GAL7*) を用いられている。*PHO5* は培地中のリン酸濃度が低い条件で活性化され、*GAL* 遺伝子群はグルコース存在下では転写が抑制され、ブドウ糖をガラクトースにすることによりプロモーターが活性化される。また最近、温度により調節されるプロモーターが開発された<sup>(10)</sup>。これは *TPI* や *ADH* のプロモーターの上流に *MAT $\alpha$ 2* のオペレーター配列を挿入した融合プロモーターを持つプラスミドを、*sin3-8* 変異を有する  $\alpha$  接合型の宿主に導入したものである。*sin3-8* は温度感受性の変異であり、低温 (25°C) では *HMR $\alpha$*  や *HML $\alpha$*  の発現が抑制され *MAT $\alpha$*  のリプレッサー蛋白が合成されないため、融合プロモーターは活性に転写される。一方、制限温

度 (35°C) 下では *sin3* 蛋白が不活性になるため *HML $\alpha$*  遺伝子から *MAT $\alpha$ 2* 蛋白が合成され、その結果融合プロモーターからの転写が阻害される。*PHO5* や *GAL* プロモーターの調節には培地を交換する必要があるのに対し、本系は温度を変えるだけでよく、生産物が宿主の生育を阻害するような場合には工業的な利用価値が高いものと思われる。

異種蛋白質の生産量を増やすために、プロモーターの改良が試みられている。筆者らは、比較的活性の強い  $\alpha$  フェロモン遺伝子 (*MF $\alpha$ 1*) のプロモーター活性を増強するため、まず転写制御領域を解析し、TATA 配列を他に 2 個の Upstream Activating Sites (UAS) を同定した<sup>(11)</sup> (図 2)。2 個の UAS 領域中には 28 bp の互いに類似した配列が存在する。この配列は 2 番目の  $\alpha$  フェロモン遺伝子 (*MF $\alpha$ 2*) や  $\alpha$  フェロモン受容体遺伝子 (*STE3*) のプロモーター領域にも認められ、 $\alpha$  細胞特異的な発現に心算の配列であることが示唆された (これは合成 DNA を用いて確認された)。2 個の UAS 配列のうち 1 個を欠失させると転写活性が約 1/10 に減少する。そこで、逆に

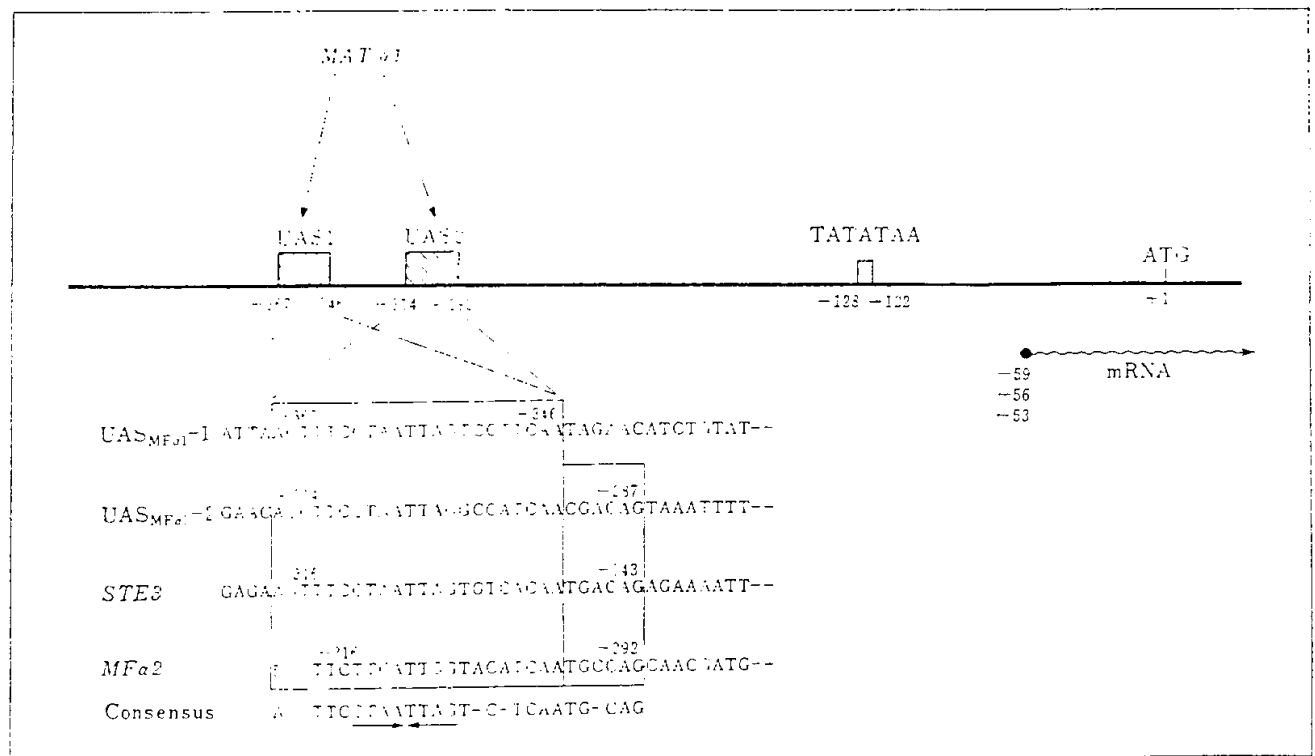


図 2 ■ *MF $\alpha$ 1* 遺伝子の転写制御領域の構造



UAS の数を増やした場合の効果を検討した結果、UAS、特に 28 bp の共通配列の数を増やすことにより、プロモーター活性が約 1.5 倍に増強されることが示された (図 3)。また、この UAS 領域で DNA が折れ曲り構造 (bending) をとることから明らかにされ、転写活性との対応が注目されている<sup>(12)</sup>。

生産性を上げるためには、上述のようなプロモーターの改良とともに、mRNA の安定性や翻訳効率を向上させる必要がある。PGK 遺伝子は宿主細胞に 1

コピー存在するが、その産物の酵素蛋白は全可溶性蛋白質<sup>(13)</sup>に達する強力なプロモーターを持つ。これを YEp 型プロモーターに挿入すると、蛋白質量は 20~50% にも達する<sup>(14)</sup>。しかし、PGK プロモーターの後に、シスターモーションなどに動物細胞由来の遺伝子を挿入すると、その発現量は 1~3% 程度に低下する<sup>(15)</sup>。この原因は現在、mRNA の安定性や翻訳効率の低下で説明されている<sup>(16)</sup>。また PGK 蛋白質が mRNA の安定化に寄与している可能性も指摘されている<sup>(17)</sup>。翻訳効率に関しては、翻訳開始コドン<sup>(18)</sup>の周辺の配列が 5'-A<sup>+</sup>A<sup>+</sup>A<sup>+</sup>A<sup>+</sup>AUGUC<sup>+</sup>U-3' であることが良いとの報告があり<sup>(19)</sup>、このように改変することも必要かも知れない。

## 異種蛋白質の分泌生産

### 1. 酵母の分泌蛋白質

酵母における蛋白質の分泌経路は本質的には高等動物の場合と同じである<sup>(20)</sup>。すなわち、細胞膜上で合成された蛋白質は、粗面小胞体→ゴルジ体→分泌顆粒→細胞膜と移送され、ペリプラズム (細胞壁と細胞質膜の間隙) や菌体外に分泌される。その間、糖鎖の付加や修飾がなされ、蛋白質分子も種々のプロセッシングを受ける。酵母の分泌蛋白質の代表的なものはいンペルターゼと酸性ホスファターゼであるが、これらの酵素は細胞

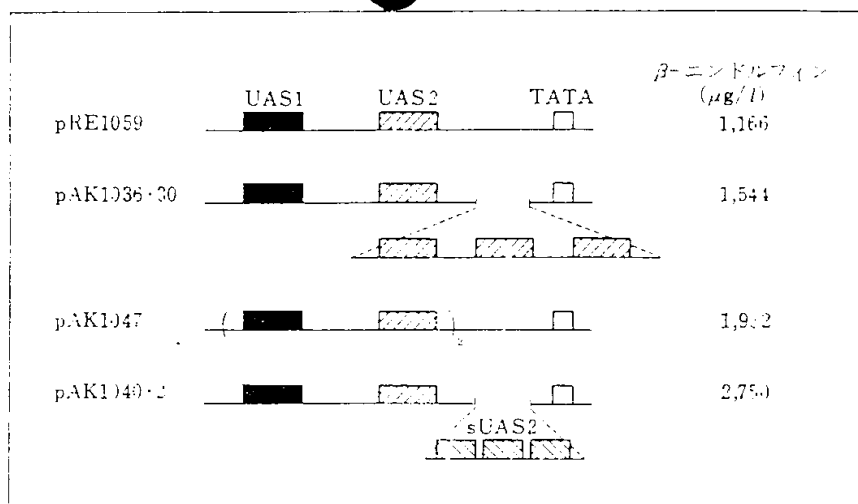


図 3 ■ UAS<sub>MEF1</sub> 配列の増加によるプロモーター活性の増強

β-インドルピンの分泌生産量で表す

■ : UAS<sub>MEF1</sub>-1, ▨ : UAS<sub>MEF1</sub>-2, □ : 28bp の共通 UAS<sub>MEF1</sub>-2

壁あるいはペリプラズムに存在し、極くわずかが菌体外に存在する。同じような局在性を示す蛋白質としては、α-ガラクトシダーゼ、L-アラビノガラクトシダーゼ、キチナーゼ、β-グルカナーゼ、アミノペプチダーゼ<sup>(21)</sup>、性的阻集因子などがある。これらの多くは高分子の糖鎖を含有しており、糖鎖間の相互作用により多量体として存在する<sup>(17)(18)</sup>。ことが、細胞壁を通過できずペリプラズムに止まる原因と推定される。事実、糖鎖合成の変異株では、インペルターゼが培地中に遊離されることが知られている<sup>(19)</sup>。

一方、酵母は少量ではあるが培地中に放出される蛋白質も生産している。最もよく知られているのは性フェロモン (α因子と a 因子) とキラー毒素である。α因子<sup>(22)</sup>は 18、a 因子<sup>(23)</sup>は 11 アミノ酸残基のペプチドであり、それぞれ α 接合型と a 接合型の *S. cerevisiae* が分泌する。接合過程において相対する接合型の細胞に作用して、性的繁殖能の誘導と DNA 合成の停止をひき起す。キラー毒素はある種の酵母が産生し、別の酵母菌を殺す蛋白質である。現在 30 種に及ぶ酵母がキラー毒素を作ることが知られている<sup>(24)</sup>が、最初に発見された *S. cerevisiae* のキラーは K<sub>1</sub> キラーと呼ばれ、二重鎖 RNA によって支配されている。この毒素蛋白は 9.5 kd と 9.0 kd の 2 つのサブユニットからなる単純蛋白質である<sup>(25)</sup>。a 因子の型



は線状 DNA プラズミドに支配されるもので、97, 33, 28 kD のサブユニットからなる<sup>12,13</sup>。

## 2. 分泌シグナルの構造

酵母の分泌蛋白質の中で、遺伝子の構造が明らかにされているものは、インペルターゼ (*SUC2*)、酸性カスプターゼ (*PHO5*, *PHO3*)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (*MEL1*)、 $\alpha$ 因子 (*MF $\alpha$ 1*, *MF $\alpha$ 2*)、 $\alpha$ 因子 (*MF $\alpha$ 1*, *MF $\alpha$ 2*)、二重鎖 RNA の毒素 (*KILM1*)、線状 DNA プラズミドの毒素 (*KIL97*, *KIL28*) などの遺伝子である。これらの蛋白質は  $\alpha$  因子の場合を除き、その N 末端に、いわゆる、シグナルペプチドを持つ前駆体として合成される (図 4)。シグナルペプチドは 20 アミノ酸残基前後の長さを持ち、N 末端から 4 残基以内に塩基性アミノ酸が存在し、その後疎水性アミノ酸のクラスターが続く。さらにシグナルペプチダーゼで切断される部位の C 末端はアラニンやセリンなどの分子量の小さなアミノ酸が存在する<sup>14</sup>。このようなシグナルペプチドを持つ遺伝子は *PHO5*, *PHO3*, *KIL28*, *SUC2*, *MEL1* であるが、*SUC2* と *MEL1* の場合は N 末端付近に塩基性アミノ酸は存在しない。塩基性アミノ酸の

存在と分泌効率を厳密に比較した例はないが、酵母では十分に必要ではないと思われる。また、*PHO5* の場合、分泌シグナルを欠失させても酸性カスプターゼが培地中に分泌されるとの報告<sup>15</sup>がある。この場合、成熟蛋白質の N 末端領域に疎水性アミノ酸配列が存在し、これがシグナルとして機能していると考えられる。

*MF $\alpha$ 1*, *MF $\alpha$ 2*, *KILM1*, *KIL97* は、いわゆるグロブリン構造を有している。単種蛋白質の分泌生産に最もよく利用されている *MF $\alpha$ 1* は、165 アミノ酸残基からなる前駆体として合成される<sup>16</sup>。成熟  $\alpha$  因子の配列は C 末端に 6~8 残基のヌルペプチド配列を含めて 4 回繰り返して存在する。N 末端の 19 アミノ酸残基は、シグナルペプチダーゼで切断されず、膜に結合したままで細胞質膜まで移送されることが示されている<sup>17</sup>が、最近その他の分泌蛋白質と同様にシグナルペプチダーゼにより切断されることが示されている。 $\alpha$  因子前駆体は粗面小胞体中で、リーダー配列中の 3 個所に糖鎖が付加され、続いてミセル体、分泌顆粒、細胞質膜上で種々のプロテアーゼによるプロセッシングを受ける。まず、膜結合型の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性ヌルペプチダーゼ (切断反応の特異性から

蛋白質	遺伝子	分泌シグナル
インペルターゼ	<i>SUC2</i>	MLIQATLELL AGFAAKISA
酸性カスプターゼ	<i>PHO5</i>	MFEEAVYSIL AASLAAA
	<i>PHO3</i>	MFEEAVYSVL AAALVAA
$\alpha$ -ガラクトシダーゼ	<i>MEL1</i>	MFAPLELTAC ISLEGVFG
$\alpha$ 因子	<i>MF<math>\alpha</math>1</i>	MFEELEIFTAV LFAASALAA PVTITTEDET AQIPAEAVIG YLLELGDFDV AVLFENSTN NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLDKEEAEA
	<i>MF<math>\alpha</math>2</i>	MEFISLELTF ILAAVSATAE SDEEIAQVPA EAIIGYLDFG GDHDLAFLPF SNATASGLIF INTTIAEAAE REQNTTLAKR EAVATA
	<i>MF<math>\alpha</math>1</i>	MQEISTATAAP KEKTSERKLN
キラー毒素	<i>MF<math>\alpha</math>2</i>	MQEISTASTQ ATQKDKSSEK ELN
	<i>KILM1</i>	MTEFTQVLR SVSILFHTL LHLNVALLIV AGPAETAPVS LLIR
	<i>KIL97</i>	MNIFYDLEFL LSFVQGLEHT HRRGSLVER
	<i>KIL28</i>	MEIYHIFSVL YLITLQAA

図 4 ■酵母の分泌性蛋白質の分泌シグナル配列

□：塩基性アミノ酸、■：酸性アミノ酸、矢印はプロセッシング部位を示す。



KR-プロテアーゼとか、*KEX*2遺伝子の産物であるもので、*KEX*2(プロテアーゼと呼ばれる)によりマターナー配列中のリジン・アルギニンの後が切断される。続いて、オキザチン・プロテアーゼによりトリプトファンは除かれ、最後にステイロイド・アラミド・プロテアーゼ(*STE13*産物)により、コルチコステロイド配列中の「ステロイド」酸(「ステロイド」酸+ステロイドの配列は省略されて脂肪酸分子が生ずる)<sup>(8)</sup>

### 3. 異種蛋白質の分泌生産

異種蛋白質の分泌生産は、酵母宿主の工業的利用の可能性を飛躍的に増大させる。そのため、基本的には、酵母の細胞内に牧草蛋白質領域のcDNA（あるいはそのコードに含まれる遺伝子）を酵母に機能するプロモーターとターミネーターの間に挿入した遺伝子コードを酵母に導入する方法が用いられる。この場合、酵母には酵母自身分泌の蛋白質遺伝子の存在、すなわち、酵母分泌型生体分子コードが存在する（図1）が通常場合である。

酵母由来の細胞膜成分の中で、*MFa1* のリン脂質が最も頻りに利用されており、これとマウス上皮がん因子<sup>140</sup>, *gag*, *src* サルモネラ<sup>140, 141</sup>, *src* フォスフェン<sup>142</sup>,  $\alpha$  *Con* <sup>143, 144</sup>, マセア<sup>145</sup>、*src* のインターフェロン<sup>2</sup>, カレントニル<sup>146</sup>, ワンドプロモセル<sup>147</sup>, *src* の *src* <sup>148</sup>, *src* のインスリン<sup>149, 150</sup>, ネバトリクラエフェロサント<sup>151</sup>、*src* の *src* <sup>152, 153</sup>、*src* の *src* <sup>154, 155</sup>、*src* の *src* <sup>156, 157</sup>、*src* の *src* <sup>158, 159</sup>、*src* の *src* <sup>160, 161</sup>、*src* の *src* <sup>162, 163</sup>、*src* の *src* <sup>164, 165</sup>、*src* の *src* <sup>166, 167</sup>、*src* の *src* <sup>168, 169</sup>、*src* の *src* <sup>170, 171</sup>、*src* の *src* <sup>172, 173</sup>、*src* の *src* <sup>174, 175</sup>、*src* の *src* <sup>176, 177</sup>、*src* の *src* <sup>178, 179</sup>、*src* の *src* <sup>180, 181</sup>、*src* の *src* <sup>182, 183</sup>、*src* の *src* <sup>184, 185</sup>、*src* の *src* <sup>186, 187</sup>、*src* の *src* <sup>188, 189</sup>、*src* の *src* <sup>190, 191</sup>、*src* の *src* <sup>192, 193</sup>、*src* の *src* <sup>194, 195</sup>、*src* の *src* <sup>196, 197</sup>、*src* の *src* <sup>198, 199</sup>、*src* の *src* <sup>200, 201</sup>、*src* の *src* <sup>202, 203</sup>、*src* の *src* <sup>204, 205</sup>、*src* の *src* <sup>206, 207</sup>、*src* の *src* <sup>208, 209</sup>、*src* の *src* <sup>210, 211</sup>、*src* の *src* <sup>212, 213</sup>、*src* の *src* <sup>214, 215</sup>、*src* の *src* <sup>216, 217</sup>、*src* の *src* <sup>218, 219</sup>、*src* の *src* <sup>220, 221</sup>、*src* の *src* <sup>222, 223</sup>、*src* の *src* <sup>224, 225</sup>、*src* の *src* <sup>226, 227</sup>、*src* の *src* <sup>228, 229</sup>、*src* の *src* <sup>230, 231</sup>、*src* の *src* <sup>232, 233</sup>、*src* の *src* <sup>234, 235</sup>、*src* の *src* <sup>236, 237</sup>、*src* の *src* <sup>238, 239</sup>、*src* の *src* <sup>240, 241</sup>、*src* の *src* <sup>242, 243</sup>、*src* の *src* <sup>244, 245</sup>、*src* の *src* <sup>246, 247</sup>、*src* の *src* <sup>248, 249</sup>、*src* の *src* <sup>250, 251</sup>、*src* の *src* <sup>252, 253</sup>、*src* の *src* <sup>254, 255</sup>、*src* の *src* <sup>256, 257</sup>、*src* の *src* <sup>258, 259</sup>、*src* の *src* <sup>260, 261</sup>、*src* の *src* <sup>262, 263</sup>、*src* の *src* <sup>264, 265</sup>、*src* の *src* <sup>266, 267</sup>、*src* の *src* <sup>268, 269</sup>、*src* の *src* <sup>270, 271</sup>、*src* の *src* <sup>272, 273</sup>、*src* の *src* <sup>274, 275</sup>、*src* の *src* <sup>276, 277</sup>、*src* の *src* <sup>278, 279</sup>、*src* の *src* <sup>280, 281</sup>、*src* の *src* <sup>282, 283</sup>、*src* の *src* <sup>284, 285</sup>、*src* の *src* <sup>286, 287</sup>、*src* の *src* <sup>288, 289</sup>、*src* の *src* <sup>290, 291</sup>、*src* の *src* <sup>292, 293</sup>、*src* の *src* <sup>294, 295</sup>、*src* の *src* <sup>296, 297</sup>、*src* の *src* <sup>298, 299</sup>、*src* の *src* <sup>300, 301</sup>、*src* の *src* <sup>302, 303</sup>、*src* の *src* <sup>304, 305</sup>、*src* の *src* <sup>306, 307</sup>、*src* の *src* <sup>308, 309</sup>、*src* の *src* <sup>310, 311</sup>、*src* の *src* <sup>312, 313</sup>、*src* の *src* <sup>314, 315</sup>、*src* の *src* <sup>316, 317</sup>、*src* の *src* <sup>318, 319</sup>、*src* の *src* <sup>320, 321</sup>、*src* の *src* <sup>322, 323</sup>、*src* の *src* <sup>324, 325</sup>、*src* の *src* <sup>326, 327</sup>、*src* の *src* <sup>328, 329</sup>、*src* の *src* <sup>330, 331</sup>、*src* の *src* <sup>332, 333</sup>、*src* の *src* <sup>334, 335</sup>、*src* の *src* <sup>336, 337</sup>、*src* の *src* <sup>338, 339</sup>、*src* の *src* <sup>340, 341</sup>、*src* の *src* <sup>342, 343</sup>、*src* の *src* <sup>344, 345</sup>、*src* の *src* <sup>346, 347</sup>、*src* の *src* <sup>348, 349</sup>、*src* の *src* <sup>350, 351</sup>、*src* の *src* <sup>352, 353</sup>、*src* の *src* <sup>354, 355</sup>、*src* の *src* <sup>356, 357</sup>、*src* の *src* <sup>358, 359</sup>、*src* の *src* <sup>360, 361</sup>、*src* の *src* <sup>362, 363</sup>、*src* の *src* <sup>364, 365</sup>、*src* の *src* <sup>366, 367</sup>、*src* の *src* <sup>368, 369</sup>、*src* の *src* <sup>370, 371</sup>、*src* の *src* <sup>372, 373</sup>、*src* の *src* <sup>374, 375</sup>、*src* の *src* <sup>376, 377</sup>、*src* の *src* <sup>378, 379</sup>、*src* の *src* <sup>380, 381</sup>、*src* の *src* <sup>382, 383</sup>、*src* の *src* <sup>384, 385</sup>、*src* の *src* <sup>386, 387</sup>、*src* の *src* <sup>388, 389</sup>、*src* の *src* <sup>390, 391</sup>、*src* の *src* <sup>392, 393</sup>、*src* の *src* <sup>394, 395</sup>、*src* の *src* <sup>396, 397</sup>、*src* の *src* <sup>398, 399</sup>、*src* の *src* <sup>400, 401</sup>、*src* の *src* <sup>402, 403</sup>、*src* の *src* <sup>404, 405</sup>、*src* の *src* <sup>406, 407</sup>、<

2.  $\alpha$ -アミラーゼ<sup>(47)</sup>, *PHO 5* ではカシのブロキセ  
<sup>(40)</sup>, *KILM 1* では *Cellulomonas fimi* のセ  
ラーゼ<sup>(48)</sup>, *KIL 97* ではマロウの  $\alpha$ -アミラー  
ゼ<sup>(49)</sup>や、 $\alpha$ -ロキセ<sup>(50)</sup>, *KIL 31* ではマ  
ロウの  $\alpha$ -アミラーゼ<sup>(51)</sup>が分泌されることなどが示さ  
れている。

MFa1 の分泌にゲートを利用した場合、異種遺伝子の挿入位置は、①89番目にリシンを後と、②89番目のアラニンに後のと例の報告されている。上皮成長因子や、ターボモジュン<sup>1)</sup>では、①の場合正常なN末端アミノ酸配列の蛋白質が分泌されるが、②の場合は、グルタミン酸-プロリン-グルタミン配列のN末端に①が結合した蛋白に代わりの割合で分泌される。したがって、②の挿入方法が良しと思われるが、このターボモジュン Con-1 では、プロリン-グルタミン-アラニン-グルタミン配列であるが、KEX2 プロテアーゼによる切断物質が良しとの指摘もあり、①の方法で挿入し、STE13 遺伝子のコード領域を適宜とすることと考えられた。

一方、酵母以外には性蛋白質を分泌するグナリンが酵母内で機能し、正例にマウスにされる例が多い。ヒトのヒゲの生毛には  $\alpha$  と  $\beta^{12}$ 、小麦<sup>13</sup>、ヒト<sup>14)</sup>、マウス<sup>15)</sup> の  $\alpha$ -グナリン、ヒト<sup>16)</sup> のグナリン、*Aspergillus awamori*<sup>17)</sup> 及び *Rhizopus oryzae*<sup>18)</sup> のグナリン、*Mucor pusillus* のグナリン<sup>19)</sup>、ヒト<sup>20)</sup> 組織から分泌されるものは、ヒトのグナリンと同一である。また、ヒト<sup>21)</sup> 肝臓蛋白から分泌する、西ドイツの大学の果実及び胚蛋白から分泌する<sup>22)</sup> など報告されている。現在まで、この成分は、マウスを用いて、別種の蛋白質を分泌させた例はほとんど報告されていない。マウス配列に構造的類似性から可能であると推定された、ヒトの、酵母が分泌するグナリンと比較して、その分泌が低い例がある。筆者等は *KIL 95*、*KIL 51* の分泌にマウスがマウス  $\alpha$ -グナリンを分泌させることが出来ることを認めたが、その分泌量はマウス  $\alpha$ -グナリン自身を用いた場合より5倍程度多かった<sup>23)</sup>。また、マウス  $\alpha$ -グナリン蛋白の分泌において、そのグナリン配





列を *PHQ5* のものと置換させると、 $\alpha$ -ガラクトースの除去や糖鎖付加の効率は著しく減少する<sup>18)</sup>。このように、目的の蛋白質と分泌システムの組合せにより分泌効率は差が出ることは“相性”と言われているように、まだ理由は明らかではない。しかし、部位特異的変異を自由に入れる現在の、その原因の解明も近いと思われる。また最近、 $\alpha$ -ガラクトースがアミノ酸配列を改変して分泌効率を上げる試みもなされている。Yamamoto ら<sup>19)</sup>は、*Aspergillus fumigatus* の 19 番目の *AspA* を *AspA1* に変えたり、3 番目から 10 番目まで、および 8 番目から 12 番目までの *AspA* のアミノ酸をすべて *AspA1* に換えた場合、 $\alpha$ -ガラクトースの分泌量はそれぞれ 1.9 倍、1.8 倍に増加させることができた。しかし、残基数は多すぎていかなるでも活性は低下する。この結果は、 $\alpha$ -ガラクトース配列の疎水性と  $\alpha$ -ガラクトース形成能が重要であることを示し、今後、 $\alpha$ -ガラクトース配列の蛋白質工学的改変がさらに試みられると思われる。

#### 4 宿主の改良

異種遺伝子の発現には、生産効率が弱を防ぐ意味でプロテアーゼ活性が弱、宿主が便行れる、酵母がプロテアーゼ活性として 3 種 (プロテアーゼ A, B, C) 知られており、これらは液胞に局在している。プロテアーゼ活性が弱い変異株が Jones<sup>20)</sup> により分離され、17 の変異株は分類されているが、この中の *pac4-3* 変異株は液胞中のプロテアーゼの活性を欠くため、宿主として好んで用いられる<sup>21)</sup>。また、酵母中のプロテアーゼについては、 $\alpha$  因子を分解する *BAK1*<sup>22)</sup> とキラー毒素を分解する *SAK1*<sup>23)</sup> がある。このため、これらのプロテアーゼの特異性の研究や異種蛋白質生産への応用についてはほとんどなされていない。筆者らは *pac4-3* と *sak1-5* を同時に持つ宿主を作製し、*Aspergillus niger* の分泌量を野生株と比較した結果、1.5~2.5 倍程度収量が上がることを認めている。

このようにプロテアーゼ活性が弱い宿主を利用するとともに、積極的に宿主に変異を起こさせ、

効率高く分泌生産する株を分離する方法も試みられている。Smith ら<sup>24)</sup>は、プロキモソンの分泌系を利用して、寒天培地上でプロキモソンの分泌量が増加した変異株を選択するシステムを開発し、2 種の劣性変異 *ssc1*, *ssc2* (supersecreting) を分離した。両株によるプロキモソンの合成量は現株と変わらないが、分泌量は 6~8 倍になり、*ssc1*, *ssc2* の両重変異株は相加的に働いていることを認めている。しかし、*ssc* 変異についての遺伝学的、生化学的解析については報告されていない。

筆者らは活性測定がプロキモソンより容易な  $\alpha$ -ガラクトースの遺伝子を *SUC2* にプロモーターとして、*Aspergillus* の液胞に挿入した変異系を用いて、寒天培地上で *Aspergillus* の変異株を分離した。この中で単一変異を持つ安定な株を選び、相補試験を行ない、*ngt1* と *osc1* と名づけた 2 つの変異株を得た。これらは親株より  $\alpha$ -ガラクトースを 6~12 倍分泌すると、mRNA 量を *SUC2* プロモーターにより調べると、*ngt1* 株では親株に数倍収量が增加していた。しかし、 $\alpha$ -ガラクトース濃度を 1% として *SUC2* プロモーターを抑制した条件下でも転写が見られ、本株は *osc1* の抑制に耐性な変異株であることが明らかになった。さらに *ngt1* をマキに持つ株体では孢子形成が見られず、細胞は細長く伸びたり、出芽が停滞したり同時に死んでいたり、また、37°C では生育できない。しかし、高温感受性の対照、変異株であることを示すことができた。一方、*osc1* 株は  $\alpha$ -ガラクトース mRNA 量は親株と同等であった。この株では孢子形成と発芽に変異があると考えられ、*osc* 変異株との関係に異性が持たれており、*ngt1* と *osc1* は  $\alpha$ -ガラクトースだけでなく他種異種蛋白質（たとえば *Aspergillus niger* の  $\alpha$ -分泌量もそれぞれ 18 倍、6 倍増加しており、今後、利用が期待される。

これまで *S. cerevisiae* を宿主とした異種蛋白質の分泌生産に関する現状を述べてきたが、この系での最高値は *Rhizopus oryzae* のグルコブロー



ーゼや *Mucor pusillus* の場合も約 200 mg/l という値である。しかし、動物由来の蛋白質では 0.1~20 mg/l のレベルである。今後、プロモーター、分泌シグナル、宿主などの改良とその結合化により、さらに効率的良質の生産系が出来るものと期待される。また、このような方向とは違って *Saccharomyces* 以外の酵母を宿主とする試みもなされ、特にメタボール産化装置 *Pichia pastoris* では、プロモーション・エンタープライズ (AOXI) のプロモーターは非常に効率的良質、菌体濃度も 180 g/l と高きまで培養でき、工業的利用価値は高いものと思われる。この系を用いて Tschopp 以下は、*Saccharomyces* のプロモーターゼを 5 g/l と高量に生産させることに成功している。これは、細胞から動物細胞を媒介により宿主細胞のゲノムを上回る数値である。今後、動物由来の蛋白質の生産性の検討が期待される。

最後に、本邦の状況を鑑み、さまざまな課題を提示します。また、本邦で進められた研究結果は、他国で工業技術的に応用できるかどうか、下で、本邦研究の現状と今後の発展の方向により行なわれたものであり、関係が深いことを謝意を表します。

## 文献

- 1) A. Hinnen, J. B. Hicks & G. F. Fink: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 190 (1978).
- 2) K. Struhl, D. T. Stinchcomb, S. Scherer & R. W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 107 (1979).
- 3) 動物細胞培養工学: 4, 32 (1981).
- 4) D. T. Stinchcomb, F. Struhl & R. W. Davis: *Nature*, 292, 30 (1979).
- 5) J. B. Hinnen, Y.-Y. Li, J. Hollman, M. Lachman, J. Alonzo, F. A. Nasmith & J. E. Hick: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47, 167 (1982).
- 6) V. A. Zakari & J. L. Smith: *Mol. Cell. Biol.*, 2, 221 (1982).
- 7) M. C. Fagan & J. F. Spett: *Gene*, 40, 17 (1987).
- 8) L. T. Emery, G. F. Clark & M. V. Olson: *Science*, 236, 100 (1987).
- 9) D. G. Frankel: in: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, ed. by J. M. Strathern, E. W. Jones and J. B. Beck, Cold Spring Harbor Lab., 1-32, p. 1.
- 10) A. L. Sienkiewicz, A. Bell, K. Hilsay & V. L. McKay: *Bio-Technology*, 6, 411 (1988).
- 11) K. Inokubo, A. Nakayama & F. Hironaka: *Mol. Cell. Biol.*, 7, 4185 (1987).
- 12) K. Inokubo, A. Nakayama & F. Hironaka: *Nucleic Acid. Res.* in press.
- 13) J. Meador, M. J. Dobson, J. A. Roberts, A. J. Kingsman & S. M. Kingsman: *Gene*, 32, 315 (1985).
- 14) C. Y. Chen & E. A. Hitzeman: *Nucleic Acid. Res.*, 15, 643 (1987).
- 15) F. Hamilton, C. K. Watanabe & H. A. de Boer: *Nucleic Acid. Res.*, 15, 3581 (1987).
- 16) F. Schekman: *Trends in Biochem. Sci.*, 7, 243 (1982).
- 17) F. Chu, W. Watanabe & F. Maley: *Arch. Biochem. Biophys.*, 223, 54 (1983).
- 18) F. C. Esmen, B. E. Esmen, I. E. Schauer, A. Taylor & F. Schekman: *J. Biol. Chem.*, 262, 4395 (1987).
- 19) M. Tamami, L. Ballou, A. Taylor & C. E. Ballou: *J. Biol. Chem.*, 262, 4395 (1987).
- 20) D. Störzler, H. H. Kütz & W. Duntze: *Eur. J. Biochem.*, 69, 13 (1976).
- 21) K. Betz & W. Duntze: *Eur. J. Biochem.*, 95, 469 (1979).
- 22) K. E. Wickner: *Plasmid*, 2, 303 (1979).
- 23) D. J. Tipper & K. A. Bostian: *Microbiol. Rev.*, 48, 125 (1984).
- 24) L. Gunge: *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 253 (1983).
- 25) F. Hishinuma, K. Nakamura, K. Hirai, F. Nishizawa, L. Gunge & T. Mieda: *Nucleic Acid. Res.*, 11, 7581 (1984).
- 26) M. I. F. Stark & A. Boal: *EMBO J.*, 5, 1155 (1986).
- 27) M. Inoue, S. Inoue, S. Pollitt, J. Ghazali & C. A. Lunn: in: *Molecular Biology: Protein Transport and Secretion*, ed. by M. Gething, Cold Spring Harbor Lab., 1981, p. 53.
- 28) S. Sibley, M. Monod, A. Hinnen & F. Huguenaurel-Tsapin: *Mol. Cell. Biol.*, 7, 336 (1987).
- 29) J. Kurjan & I. Herskowitz: *Cell*, 30, 903 (1982).
- 30) D. Julius, R. Schekman & J. Thorner: *Cell*, 36, 309 (1984).
- 31) D. Julius, A. Brake, L. Blair, F. Kunisawa & J. Thorner: *Cell*, 37, 1075 (1984).
- 32) D. Julius, L. Blair, A. Brake, G. Spargues & J. Thorner: *Cell*, 32, 593 (1983).
- 33) A. Furukawa, K. Matsumoto & F. Tamanoi: *EMBO J.*, 6, 123 (1987).
- 34) A. J. Brake, J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Herberich, F. F. Masarz, G. F. Mullenbach, M. S. Faden, P. Valenzuela & P. J. Barr: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4942 (1984).
- 35) G. A. Butler, K. K. Chen, A. F. Banks & P. H. Lane: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5310 (1984).
- 36) K. M. Tseris, H. Liu, J. L. Fierenko, L. Goldstein, J. Davis, K. Duker, S. V. Suggs, P. Lai & G. A. Butler: *J. Biol. Chem.*, 261, 5858 (1986).
- 37) A. Singh, J. M. Lagoridis, W. Konr & L. J. Perry: *Nucleic Acid. Res.*, 12, 8927 (1984).
- 38) A. Matsujima, M. W. Bond, K. Otsu, K. Arai & N. Arai: *Gene*, 37, 153 (1986).
- 39) V. Price, D. Mochizuki, G. J. March, D. Casman, M. C. Fecien, J. Kleink, W. Cleverley, S. Gills, P. Baher & D. Urdal: *Gene*, 55, 287 (1977).
- 40) E. A. Smith, M. J. Dutton & D. T. Mor: *Science*, 229, 1219 (1985).
- 41) J. F. Ernst: *DNA*, 5, 443 (1985).
- 42) L. Thim, M. T. Hansen, K. Norris, I. Hoeglin, E. Boel, J. Forstrem, G. Ammerer & J. P. Foll: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6766 (1986).
- 43) L. Thim, M. T. Hansen & A. F. Sørensen: *FEBS Lett.*, 212, 307 (1987).
- 44) K. J. Shaw, B. E. Frommer, J. A. Anagnost, S. Narula & P. J. Leibowitz: *DNA*, 7, 418 (1988).
- 45) G. Loison, A. Finkel, S. Bernart, M. Nguyen-Juillet, M. Marquet, N. Fiehl-Bellon, D. Carvalho, L. Guerra:



- Santos, S.W. Brodeur, M. Courtney, C. Boitsch & Y. Lemoine : *BioTechnology*, 6, 72 (1988).
- 46) C. N. Chang, M. Matteucci, L. J. Perry, J. J. Wulff, C. Y. Chen & R. A. Hitzeman : *Mol. Cell. Biol.*, 6, 1512 (1986).
- 47) M. Nishizawa, F. Ozawa & F. Hishinuma : *Agric. Biol. Chem.*, 51, 515 (1987).
- 48) N. Skipper, M. Sutherland, R. W. Davies, D. Kilburn, R. C. Miller Jr., A. Warren & R. Wong : *Science*, 230, 958 (1985).
- 49) M. Tokunaga, N. Wada & F. Hishinuma : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 613 (1987).
- 50) C. Balleri, J. A. H. Murray, P. Ghisla, G. Cesareni & C. L. Galletti : *EMBO J.*, 6, 229 (1987).
- 51) M. Tokunaga, A. Kawamura & F. Hishinuma : *Nucleic Acids Res.*, in press.
- 52) R. A. Hitzeman, D. W. Leung, L. J. Perry, W. J. Kotr, H. L. Levine & D. V. Goeddel : *Science*, 219, 620 (1982).
- 53) S. J. Rhee, C. M. Lazarus, W. E. Smith, D. C. Baulcombe & A. A. Gatenby : *Nature*, 303, 602 (1981).
- 54) T. Saito, S. Tsunashima, Y. Nakamura, M. Imai, F. Sakayama & H. Matsubara : *Gene*, 50, 247 (1986).
- 55) J. Ohter, & J. Davidson : *Gene*, 40, 67 (1987).
- 56) Y. Jigami, M. Moraki, N. Harada & H. Tanaka : *Gene*, 43, 277 (1986).
- 57) M. A. Innis, M. J. Holland, P. C. McCool, E. G. Odeh, V. P. Wittman, E. Tal, H. W. K. Watt, D. H. Gelrand, J. P. Holland & J. H. Meade : *Science*, 228, 21 (1985).
- 58) T. Ashikari, N. Nakamura, Y. Tanaka, N. Kiuchi, Y. Shibano, T. Tanaka, T. Amachi & H. Yoshizumi : *Agric. Biol. Chem.*, 50, 957 (1986).
- 59) N. Tenouchi, H. Shoun, T. Uozumi & T. Beppu : *Nucleic Acids Res.*, 14, 7557 (1986).
- 60) A. J. Moody, F. Norris, K. Norris, M. T. Hansen & L. Thim : *FEBS Lett.*, 212, 38 (1987).
- 61) M. A. Jabbar & D. P. Nayak : *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1476 (1987).
- 62) J. H. Cramer, K. Lea, M. D. Haber & P. Kramer : *Mol. Cell Biol.*, 7, 121 (1987).
- 63) L. Leden, I. Bom, A. M. Loeferer, J. Moat, M. Y. To non, C. Visser & C. T. Verrips : *Cell*, 37, 629 (1984).
- 64) Y. Yamamoto, Y. Taniyama, M. Kikuchi & M. Ikenari : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 481 (1987).
- 65) E. W. Jones : *Genetics*, 85, 13 (1977).
- 66) V. L. MacKay, S. K. Wain, M. T. Insley, T. R. Manney, J. Holly, G. C. Saari & M. I. Parker : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 75 (1988).
- 67) H. Bussey, O. Steinmetz & D. S. Dillo : *Current Genetics*, 7, 449 (1983).
- 68) A. Sekai, Y. Shimizu & I. H. Hartman : *Genetics*, 119, 499 (1988).
- 69) J. F. Tschopp, G. Sierlow, F. Kesson, W. Craig & L. Grunwald : *BioTechnology*, 5, 140 (1987).

石井 肇 (Masaru Ishii) 昭和11年  
1月19日生。大分県大分市出身。東京  
大学医学部卒業。1938年同大学医学部第二  
内科入局。41年同院助手。49年埼玉医科大学  
教授。51年同校。56年同校教授。58年長  
野県立、61年、研究チームを創設。腫瘍  
マーカー、特に basic fetoprotein「腫  
瘍マーカー」の発達の意義に研究を続け  
ていた。1974年、第一著者として、肝臓癌  
組織 (HAM, マーカース) (A3HQ)

内宮 博文 (Hiroyumi Uenoi)   
 Vol.20, No.11: p.798 表紙, 巻末, 読  
者大先生外科部助教授

応多夢（イノセント）夢多夢政治  
 夢多食物学外に在る、専門は政治学、食  
 品の学、起るは政治、政治、又政治  
 の夢多、政治は政治、政治、又政治  
 の夢多、政治は政治、政治、又政治  
 の夢多、政治は政治、政治、又政治

大野 豊 (Yoshitaka Ono) 昭和10年  
8月24日生(岐阜)>昭和33年進了ナガサ  
キ大学生物科学部環境・同年度分ナガサ  
キ大学環境造形科学研究科卒業、以後に、  
たかく藤田大学(大垣市)>環境造形科に在  
籍する。今、大垣市で建築家として活動中。

岡山 清司 (Kiyoshi Okayama) 2014



などに見響されるし、それを測定することは困難である。さらに、包接物質が親水性か、脂肪親和性かによって細胞内での分布も可溶性部、あるいは膜に局在している可能性も考慮しなければならない。一般に、光感受性物質は不安定で暗所でも少しずつ分解していることがあるので、微妙な実験では使用直前に純度のチェックや精製をすることが望ましい。

現在、caged ATP は国産品があり、caged cAMP, cGMP, 酢酸などは Molecular Probe Inc. から入手できる。

以上述べたように、光による反応の開始など光化学反応の利用は、適切な光感受性物質と強い光源が得られれば、容易に行なうことができるので、今後大いに発展することが期待される。

1) A. M. Gurney & H. A. Lester: *Physiol. Rev.*, 67, 583 (1987).

2) P. DeWeer & B. M. Salzberg (ed.): "Optical Methods in Cell Physiology", (Soc. Gen. Physiol. Ser. 40), Wiley, New York, 1986.

3) J. H. Kaplan, B. Forbush III & J. F. Hoffman: *Biochemistry*, 17, 1929 (1978).

4) J. A. McCray, L. Herbet, T. Kihara & D. R. Trentham: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7237 (1980).

5) 柳田 敏雄 *Dojin Tech. Bull.*, No. 87009 (1987).

6) R. Y. Tsien & R. S. Zucker: *Biophys. J.*, 50, 843 (1986).

7) J. A. McCray & D. R. Trentham: *Biophys. J.*, 47, 406a (1985).

8) K. Shimada & H. C. Berg: *J. Mol. Biol.*, 193, 585 (1987).

(嶋田 勝彦, 名古屋市立女子短期大学)

## 化学と生物

Vol. 26, No. 9 (298 号)

昭和 63 年 9 月 25 日発行 (月刊)

定価 740 円

編集者 ● 社団法人 日本農芸化学会

発行者 ● 株式会社 学会出版センター  
113 東京都文京区本郷 6-2-10

印刷者 ● 新日本印刷株式会社

挿図 ● 伊藤 允三

装幀 ● 万 膳 寛

### ■ 企画委員会

荒木 和美 (協和発酵工業株式会社東京研究所)  
伊藤 和夫 (東北大学農学部農芸化学科)  
片山 純男 (雪印乳業株式会社生物科学研究所)  
久保田浩二 (味の素株式会社中央研究所)  
桑 本 融 (京都大学理学部化学科)  
高 阪 勲 (名古屋市大学医学部)  
向 正信 (藤沢薬品工業株式会社筑波研究所)  
金野 隆光 (農林水産省農業研究センター)  
斎 藤 恭子 (農林水産省食品総合研究所)  
柳 祥公 (国立予防衛生研究所)  
匂坂勝之助 (北海道大学低温科学研究所)  
志賀 一一 (神戸大学農学部農芸化学科)  
首藤 松一 (東京大学薬学部薬学科)  
杉山 達夫 (名古屋市大学農学部農芸化学科)  
千 田 貴 (京都大学農学部農芸化学科)  
高野 光男 (大阪大学工学部醸造工学科)

高橋 秀夫 (東京大学応用微生物研究所)  
千葉 誠哉 (北海道大学農学部農芸化学科)  
富 田 武 (名古屋市大学農学部畜産学科)  
中村 博三 (群馬大学工学部化学工学科)  
原 田 宏 (筑波大学生物科学系)  
結津 軍喜 (九州大学農学部農芸化学科)  
松本 義明 (東北大学農学部農学科)  
村上 浩二 (京都大学農学部林産工学科)  
室 伏 旭 (東京大学農学部農芸化学科)  
安 元 健 (東北大学農学部食糧化学科)  
山口 勝三 (東京大学農学部畜産学科)  
吉岡 宏輔 (理化学研究所)

### 企画委員長

齋藤 日向 (東京大学名誉教授, 京都大学教授)

### 企画理事

魚住 武司 (東京大学農学部応用生命工学科)  
小林 嗣夫 (お茶の水女子大学家政学部食物学科)





<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/81, 1/19, C12P 21/02</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/09718</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年2月24日(24.02.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/04332  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年8月10日(10.08.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/236621 1998年8月10日(10.08.98) JP 特願平11/84583 1999年3月26日(26.03.99) JP  <b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について) 明治乳業株式会社 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD)[JP/JP] 〒104-0031 東京都中央区京橋2丁目3番6号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人</b> (米国についてのみ) 村杉 章(MURASUGI, Akira)[JP/JP] 浅見幸夫(ASAMI, Yukio)[JP/JP] 〒250-0862 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業ヘルスサイエンス研究所内 Kanagawa, (JP) 城戸 勲(KIDO, Isao)[JP/JP] 熊井英志(KUMAI, Hideshi)[JP/JP] 〒250-0862 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社 細胞工学センター内 Kanagawa, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54) Title: MASS SECRETION/EXPRESSION SYSTEM OF TRUE MK FAMILY PROTEIN</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系  <b>(57) Abstract</b> A <i>Pichia</i> yeast, which has been transformed by an expression vector containing an MK family protein gene ligated to an $\alpha 1$ factor signal sequence originating in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> under the regulation of a methanol-inducible alcohol oxidase gene (AOX1) promoter originating in <i>Pichia pastoris</i> and a transcription termination factor, is cultured and a true MK family protein is thus secreted and expressed on a mass scale in the culture supernatant.		

ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 由来のメタノール誘導性のアルコール  
 オキシダーゼ遺伝子 (AOX1) プロモーターおよび転写終結配列の支配下に、サッカ  
 ロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来の  $\alpha 1$  因子のシグナル  
 配列を連結したMKファミリータンパク質遺伝子を含む発現ベクターにより形質  
 転換されたピキア酵母を培養して、培養上清中に真正MKファミリータンパク質  
 を大量に分泌発現させる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルニダッド・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダッド・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

## 真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系

## 分野

発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とした、組換え DNA 技術による、真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系に関する。

## 技術

MKは、レチノイン酸応答遺伝子の産物として発見された増殖因子で、塩基性アミノ酸とシステインに富む分子量 13 kDa のポリペプチドである (Kadomatsu et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318; Tomomatsu et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770, 1990)。MKは、プレイオトロフィン (Pleiotrophin: PTN) あるいはヘパリン結合性増殖因子 (heparin binding growth associated molecule: HB-GAM) と呼ばれるもう一つのヘパリン結合性タンパク質とは、45%の配列相同性を示す。

MKとPTNは、神経栄養因子活性 (Li, Y.-S. et al.: Science, 250: 1690-1692, 1990; Merenmies, J. & Rauvala, H.: J. Biol. Chem., 265: 16721-16924, 1990; Muramatsu, H. et al.: Dev. Biol., 110: 284-296, 1985)、線溶系亢進 (Nishida, S. et al.: J. Biol. Chem., 270: 9590-9596, 1995)、種々細胞の増殖、NET3細胞のトランスフォーム (Kadomatsu, K. et al.: Brit. J. Cancer., 75: 359, 1997; Yokota, C. et al.: J. Biochem., 123: 339-346, 1998)、血管新生といった活性を共有する。

このように、MKファミリーのタンパク質は、医薬品として、その有用性が期待されるので、これらのタンパク質を大量に発現する系の開発が望まれている。天然のMKタンパク質、およびPTNタンパク質は、糖が付加されていない。し

たがって、これらのタンパク質を組換えDNA技術により糖の付加が無い状態で大量発現できれば、医薬品への応用だけでなく、構造・機能解析への利用など、その有用性は極めて大きいと考えられる。なお本発明において、糖の付加を伴わないMKファミリータンパク質を真正MKファミリータンパク質と言う。ここでMKファミリータンパク質は、MKやPTN、並びにそれらの機能的に同等な変異体の、少なくとも成熟タンパク質を構成するアミノ酸配列を含むタンパク質を意味する。またMKとPTNについても、糖の付加を伴わないものを特に真正MK、あるいは真正PTNとそれぞれ称する。

MKファミリータンパク質の発現系として、メタノール資化性酵母（以下「メチロトロフィック酵母;methylotrophic yeast」と称する）は、好適と考えられる。一般に、酵母は、単細胞真核生物であり、分子生物学的知見が豊富であることや、安全性、培養の容易な点などから、組換えDNA技術により、有用なタンパク質を生産する際の宿主として利用されている。特に、酵母の分泌発現系は、発現されたタンパク質が細胞外に放出されるため、連続培養が可能で大幅な生産量の増加が期待でき、さらに、細胞を破碎する手間がいらないので、精製は容易となる。

そこで、本発明者らは、メチロトロフィック酵母であるピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主としたMKタンパク質の大量分泌発現系の確立を試みてきた。ピキア・パストリスによる異種遺伝子発現系が開発され、該発現系によるB型肝炎ワクチンの生産やインベルターセの高分泌発現が報告されている (Cregg, J. M. et al. : Bio/Technology, 11 : 905-910, 1993)。しかしながら、MKタンパク質の発現にMKタンパク質固有の分泌シグナルを用いた場合、その発現量は少なく (30~50mg/L)、そのうえ、発現したMKタンパク質の大部分は、動物細胞で付加される糖とは異なる酵母由来の糖を結合している。すなわち、真正MKタンパク質の含有量は極めて少ない。酵母由来の糖を有するMKタンパクを医薬品として用いた場合には、抗原性の問題が生じる。そこで、発現産物から真正MKタンパク質の分離・精製が必要となる。しかし糖の有無のみにおいて相

違し、共通のアミノ酸配列を持ったタンパク質を分離・精製することは極めて困難である。

本発明者らは、真正MKタンパク質の発現量の増加を目指して、発現カセットのコピー数を増加させた発現株を多数作製して発現を試みたが、MKタンパク質の場合、コピー数はあまり関係ないようで、ファーメンタ(fermenter)での発現量が従来株の約2倍程度の細胞株は得られたものの、真正MKタンパク質の大幅な発現の増加が見られる株は得られなかった。

#### 発明の開示

したがって、本発明は、メチロトロフィック酵母を宿主とした真正MKファミリータンパク質の大量分泌発現系の確立を課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、メチロトロフィック酵母のアルコールオキシダーゼのプロモーター支配下に、成熟MKファミリータンパク質をコードするcDNAを、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)の $\alpha 1$ 因子遺伝子のブレプロ配列の直後に結合させたMKファミリータンパク質発現ベクターを構築し、これを用いてメチロトロフィック酵母を形質転換させたところ、得られた形質転換体が、培地中に、活性型の真正MKファミリータンパク質を大量に分泌発現することを見出した。更に、真正MKファミリータンパク質の発現には、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列に成熟MKファミリータンパク質をコードする遺伝子を組み合わせることが重要な条件であることを明らかにし本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下のベクターと、このベクターによる形質転換体を培養し分泌発現物として真正MKファミリータンパク質を回収する工程を含む真正MKファミリータンパク質の製造方法に関する。

- (1) サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来の $\alpha 1$ 因子のシグナル配列に成熟MKファミリータンパク質をコードする遺伝

子を連結したことを特徴とする、メチロトロフィック酵母による真正MKファミリータンパク質の分泌発現用ベクター。

(2) 下記の要素(a)から(g)で構成されることを特徴とする、(1)に記載のベクター。

(a)ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1)プロモーター配列、

(b)サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の $\alpha$ 1因子のシグナル配列、

(c)(b)に連結された成熟MKファミリータンパク質をコードする遺伝子、

(d)ピキア・パストリス由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1)の転写終結配列、

(e)大腸菌及びメチロトロフィック酵母 (methylophilic yeast)で機能する選択マーカ遺伝子、

(f)大腸菌で機能する複製開始点、及び

(g)メチロトロフィック酵母染色体 DNA への部位特異的相同組換えのための 5' AOX1 及び 3' AOX1

(3) MKファミリータンパク質が、MKタンパク質である(1)に記載のベクター。

(4) MKファミリータンパク質がPTNタンパク質である(1)に記載のベクター。

(5) (1)から(4)のいずれかに記載のベクターで形質転換したメチロトロフィック酵母からなる形質転換体。

(6) ベクターが(3)に記載のベクターであり、メチロトロフィック酵母がSMD1168である、(5)に記載の形質転換体pPIC9DP-hMK/SMD1168。

(7) ベクターが(4)に記載のベクターであり、メチロトロフィック酵母がGS115である、(5)に記載の形質転換体pPIC9-hPTN/GS115。

- (8) (5) から (7) のいずれかに記載の形質転換体を培養し、分泌発現産物を回収する工程を含む、真正 MK ファミリータンパク質の製造方法。
- (9) 次の工程を含む、(8) に記載の真正 MK ファミリータンパク質の製造方法。
- (a) (6) に記載の形質転換体を培養する工程
- (b) pH4 で増殖後に 20°C、pH3 の条件下で MK タンパク質の発現を誘導する工程
- (c) 分泌発現産物を回収する工程

一般に、分泌タンパク質は、その N 末端側にシグナル配列（プレ配列）と呼ばれる 20～30 アミノ酸からなる配列を有する前駆体として合成される。更にプロテアーゼなどの加水分解酵素、ホルモン、増殖因子などの多くは、このシグナル配列とは別に成熟部分に隣接したプロ配列と呼ばれる余剰部分をもつ。このプロ配列の機能については、成熟タンパク部分のジスルフィド結合の正しい形成に必須であること (Weissman, J. S. & Kim, P. S.: Cell, 71: 841-851, 1992)、成熟タンパク部分の膜透過に関与すること (Wiren, K. M. et al.: J. Biol. Chem., 263: 19771-19777, 1988)、あるいはプロ配列が成熟タンパク部分と相互作用し、活性のある正しい高次構造の形成を促進する機能をも有していること (Winther, J. L. & Sorensen, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88: 9330-9334, 1991))、など、いくつかのプロ配列の機能の解析例が報告されているが、まだ不明な点も多い。また、シグナル配列を他のシグナル配列又はプレプロ配列に置換すると、シグナルペプチドの除去や、糖鎖付加の効率が著しく減少するとの報告もある (Cramer, J.H. et al.: Mol. Cell. Biol., 7: 121, 1987)。本発明においては、このプレプロ配列を含めて「シグナル配列」という。ここでは、シグナル配列は、アミノ酸配列を意味すると同時に、それをコードする cDNA の塩基配列を意味する場合もある。

酵母の分泌タンパク質の中で、遺伝子のシグナル配列の構造が明らかにされて

いるのは、インベルターゼ (SUC2)、酸性ホスファターゼ (PHO5、PHO3)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (MEL1)、 $\alpha$ 因子 (MF $\alpha$ 1、MF $\alpha$ 2)、a因子 (MFa1、MFa2)、二重鎖RNAキラー毒素 (KILM1)、線状DNAプラスミドのキラー毒素 (KIL97、KIL28) などの遺伝子である。MF $\alpha$ 1、MF $\alpha$ 2、KILM1、KIL97は、アレプロ構造を有している。異種タンパク質の分泌生産に最もよく利用されているMF $\alpha$ 1のシグナル配列は、85~89アミノ酸残基からなる (J. Kurjian & I. Herskowitz: Cell, 36: 933, 1982)。

異種タンパク質の分泌生産を飛躍的に高めるために、基本的には、分泌シグナルの直後に、タンパク質領域をコードするcDNA、またはイントロンを含まない遺伝子を、酵母で機能するプロモーターとターミネータの間に挿入した発現ベクターが用いられる。分泌シグナルには、酵母固有の分泌タンパク質遺伝子のもつシグナルか、酵母以外の分泌シグナルが用いられる。

本発明の、MKファミリーのタンパク質の分泌生産に使用する発現ベクターは、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989) に記載の標準的な方法で構築できる。発現ベクターは、適切なメチロトロフィック酵母の発現ベクターを使用する。本発明の実施に好適なベクターとは、ビキア属および最も好適には、ビキア・パストリスGS115 (寄託番号; NRRL Y-15851) にも適合するベクターである。本発明における好ましい発現ベクターのひとつとして、例えば、図5に示す発現ベクターpPIC9 (Phillips Petroleum Co.,) を用いることができる。該ベクターは、選択マーカーとして、大腸菌およびビキア・パストリスのそれぞれでの選択に必要な遺伝子すなわちアンピシリン耐性遺伝子 (Ampicillin) およびビキア酵母ヒスチジノール脱水素酵素遺伝子 (HIS4)、をもつシャトルベクターである。またこの発現ベクターは、次のような要素で構成されている。

大腸菌中で機能する複製開始点 (ColE1)、



異種遺伝子を発現させるためのピキア酵母アルコールオキシダーゼのプロモーター (5' AOX1)、

サッカロミセス・セレビスエの $\alpha$ 1因子分泌シグナルをコードするDNA (S)、

AOX1遺伝子の転写終結配列 (3' AOX1-TT)、および

5' AOX1と共にピキア・パストリス染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1

$\alpha$ 1因子シグナル配列を利用する場合、異種遺伝子の挿入部位は、(1) 85番目のLysの後と、(2) 89番目のAlaの後の2例が報告されている(菱沼文夫：化学と生物、26: 568~576, 1988)。本発明では、MKファミリータンパク質自身のシグナル配列に換えて、図3に示す、サッカロミセス・セレビスエの $\alpha$ 1因子シグナル配列を利用することを特徴としている。MK遺伝子の場合は $\alpha$ 1因子のアプレロ配列の最後のLys-Argに続くスパーサー配列Glu-Ala-Glu-Alaの直後(すなわち、上記(2)の例)に、あるいはその後に位置するEcoRI部位に、成熟タンパク質をコードする遺伝子を挿入するのが好ましい。またPTN遺伝子の場合は、最後のLys-Argの直後が成熟タンパク質をコードする遺伝子の挿入位置として好ましい。

MKファミリータンパク質の構造遺伝子は、すでに公知である。すなわち、ヒトMK遺伝子は、Met (1-3のATG) から、Ala (64-66のGCC) に至る22個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、それに続くLys (67-69のAAA) からAsp (427-429のGAC) に至る121個のアミノ酸からなる成熟タンパク質をコードしている(配列番号：1の核酸配列、および配列番号：2のアミノ酸配列参照)。また、PTNタンパク質の遺伝子は、Met (1-3のATG) から、Ala (94-96のGCA) に至る32個のアミノ酸からなるシグナルペプチドと、それに続くGly (97-99のAAA) からAsp (502-504のGAT) に至る136個のアミノ酸からなる成熟タンパク質をコードしている(配列番号：6の核酸配列、および配列番号：7のアミノ酸配列参照)。なお本発明におけるMKファミリータンパク質には、天然のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列で構成されるタンパク質のみならず、MKタンパク質と機能的に同等の活性を有し、そのアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、

および/または挿入されたアミノ酸配列からなる変異体が含まれる。更に本発明における真正MKファミリータンパク質とは、少なくともMKタンパク質の成熟タンパク質を構成するアミノ酸配列を含み、糖の付加をとみなわないタンパク質を意味する。MKファミリータンパク質の活性は、実施例に示すように、たとえばSwissマウス胎児由来の株化線維芽細胞NIH3T3に対する細胞増殖促進活性によって評価することができる。また当業者であれば、MKあるいはPTNタンパク質の生物学的機能を損なうことなく、これらの遺伝子配列の限定改変を行うことが可能である。

MKファミリーのタンパク質をコードする遺伝子は、該遺伝子の増幅に適切なセンスPCRプライマーおよびアンチセンスPCRプライマー（MK遺伝子の場合は配列番号：3、4、あるいは5、PTN遺伝子の場合は配列番号：8、および9）を用い、該遺伝子を鋳型としてPCRを行い、遺伝子を増幅する。この場合、プライマーには、発現ベクターに含まれる適切な制限酵素認識部位を含ませる。次いで、該遺伝子を発現ベクターの適切な制限酵素切断部位に挿入する。MKファミリーの成熟タンパク質遺伝子を含む発現ベクターで大腸菌HB101、あるいはXL1-Blue MRF'を形質転換する。形質転換した大腸菌クローンをいくつか選び、これに含まれる発現ベクターを鋳型とし、適当なプライマーを使用してPCRを行い、挿入遺伝子の向きが正しいことを確認する。この発現ベクターについて、MK遺伝子および挿入部位付近の塩基配列を決定し、塩基配列に誤りのないことを確認する。

形質転換のための酵母宿主は、適切なメチロトロフィック酵母すべてを含む。メチロトロフィック酵母は、ハンセンラ（*Hansenula*）、カンジダ（*Candida*）、クロエケラ（*Kloeckera*）、ピキア、サッカロミセス、およびロドトルラ（*Rhodotorula*）からなる属から選択される、メタソール存在下で増殖可能な酵母を含む。好適には、栄養要求性ピキア・パストリスGS115（NRRL Y-15851）などのピキア属のメチロトロフィック酵母である。例えばSMD1168（Phillips Petroleum Company）のよ

うに、プロテアーゼ活性の低下しているメチロトロフィック酵母を宿主として用いれば、発現産物のプロテアーゼによる分解の抑制を期待できる。MKファミリータンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを導入するための形質転換法には、プロトプラスト法 (Hinen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929, 1978)、リチウム法 (Ito, H. et al.: J. Bacteriol., 153: 163, 1983)、あるいは電気パルス法 [D.M. Becker, L. Guarente, "Method in Enzymology", ed. by C. Guthrie, G. Fink, Vol. 194, p. 182, Academic Press, New York(1991)] など公知の方法を利用することができる。例えば、電気パルス法を用いる場合は、Invitrogenのプロトコール (例えば、pPICZA $\alpha$ , B, C, Version A, 160410, 25-0150) を用いることができる。

形質転換されたメチロトロフィック酵母は、栄養要求性酵母を形質転換後 (酵母の栄養要求性に従って) 栄養素を含まない培地による選択と、新しい表現型 ("メタノール利用能+/-, Mut+/-") を検出することによる単離、または、形質転換体に耐性遺伝子を含む場合は、酵母に対して毒性を有する抗生物質の存在下で培養することにより単離できるが、これらに限定されない。

単離した形質転換メチロトロフィック酵母は、フラスコ振とう培養法、高密度培養法のような適切な培養技術によって培養される。MKファミリータンパク質の発現は、ベクターに含まれる発現調節領域に応じた方法により達成できる。例えばpPIC9では、アルコール オキシダーゼのプロモーターが発現制御領域となるので、メタノールの存在下形質転換酵母を培養することによりプロモーター制御下にある遺伝子の発現を誘導することができる (特開平7-111891および特開平8-228779参照)。

ヒトMKタンパク質のシグナル配列を使用した発現株 (pHILD4-hMK/GS115) と $\alpha$ 1因子のシグナル配列を含む発現株 (pPIC9K-4AhMK/GS115) のファーマンタ培養におけるMKタンパク質の発現量をELISA法で比較すると、図6に示すように、ヒトMKタンパク質のシグナル配列を含む発現株の場合、培養4日目、発現量

が30-50mg/Lであるのに対して、 $\alpha 1$ 因子を含む発現株の場合には、約200mg/Lであり、さらに、培地にEDTAを加えると、約240mg/Lの発現量となっている。一方、同じサンプルをFPLC分析にて測定すると、図7に示すように、EDTAを加えた場合の発現量は約640mg/L (MKタンパク質1mg/mL=1.8A<sub>280</sub>)であり、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を使用した方が、ヒトMK自身のシグナル配列を使用した場合よりも5倍以上の発現量が得られることが明らかである。MK自身のシグナル配列を利用した発現株 (pHILD4-hMK/GS115) を培養し、発現されたMKをS P-セファロースおよびヘパリンセファロースにより精製し、MALDI法 (matrix-assisted laser desorption ionization/ time-of-flight mass spectrometer) で質量分析した結果を図11に示す。真正MKのピークは最も高い (測定値13241.6) が、糖が一個から18個結合していると考えられるMKのピークが観察され、これらの総量は真正MKの発現量を大きく上回る。

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115のファーマンタ培養上清からMKタンパク質を精製して質量分析すると、図8に示すように、真正MKタンパク質の他に、アミノ末端から、Tyr-Val-Glu-Phe-Lysの5アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lysの7アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lys-Asp-Lys-Val-Lys-Lysの12アミノ酸が除かれたものが観察される。また、発現物のアミノ末端分析の結果、Tyr、Lys、Aspが検出され、これらは予想発現物MKタンパク質、アミノ末端から5アミノ酸除かれたもの、および7アミノ酸が除かれたもののアミノ末端のアミノ酸と一致する。しかし、糖の結合したMKの明らかなシグナルは観察されない。これらの結果から、MKに糖の結合が少ないことが明らかである。

すなわち、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を使用すると、MK自身のシグナル配列を使用する場合と比較して、真正MKタンパク質の発現量が著明に増大すること、およびMKファミリータンパク質への糖の結合が低く抑えられることが明らかである。

さらに、発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168のファーメンタ培養におけるMKタンパク質の発現量をFPLCにより測定すると、図9に示すように、MKタンパク質の発現量は、培養8日目に、最大の360mg/Lに達している。7日目の培養液10mlからMKタンパク質を、精製してMALDI法で質量分析すると、図10に示すように、真正MKタンパク質の理論分子量13241.3(+1)とほぼ同じ13241.2(+1)を示し、糖の結合したMKによるシグナルも認められない。宿主をGS115からSMD1168に変更するとともに培養条件を変えた結果、分解物の量はごく僅かとなっている。そして、アミノ末端のアミノ酸配列は、表1に示す様に真正MKタンパクのアミノ末端のアミノ酸配列に一致しており、アミノ酸組成分析の結果も、表2に示すように、期待値及び化学合成の成熟MKタンパク質（標準物質）とよく一致している。

このようにして得られた本発明の真正MKタンパク質の生物活性を、NIH3T3細胞に対する細胞増殖促進活性で検討すると、図13に示すように、生細胞数は用量依存的に増加することが認められる。

また、本発明により得られた真正MKタンパク質の2次構造に関する情報を得るために、CD (circular dichroism) スペクトルを測定した結果を図12に示す。スペクトル全体の形は、逆平行 $\beta$ 構造を含むタンパク質のスペクトルと類似している。 $\beta$ 構造を示すと考えられる215nm付近の負のピーク由来と見られる肩が明らかである。上記したMKタンパクのNMR解析結果から、MKタンパクには、ほとんど $\beta$ 構造しか観察されないので (Iwasaki, W. et al.: EMBO J. 16 : 6936-6946, 1997)、このスペクトルの結果とよく一致している。すなわち、本発明により得られた真正MKタンパク質はその立体構造をよく保っていると考えられる。

また、本発明によれば、PTNタンパクについても、図14のHPLC溶出プロフィール、および図16の質量分析結果に示すように、真正PTNタンパク質が約250mg/Lと高発現で得られており、真正PTNタンパク質の大量分泌発現系が提供される。

### 図面の簡単な説明

図1は、ピキア酵母酸性ホスファターゼ分泌シグナル部分の塩基配列を示す図である。Vは、シグナルペプチドの切断部位を示す。

図2は、MKタンパク質発現ベクターに使用するpPHIL-S1の構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター(5' AOX1)、ピキア酵母酸性ホスファターゼ(PH01)のシグナル配列(S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列(3' AOX1-TT)、および5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、ColE1およびバクテリオファージf1のものを含み、選択マーカとして、アンピシリン耐性遺伝子(Ampicillin)、およびピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(HIS4)を含む。

図3は、サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha$ 1因子分泌シグナル部分の塩基配列を示す図である。(1)は、プレ配列の切断部位を、(2)は、プレプロ配列の切断部位を、(3)は、ジペプチдилアミノペプチダーゼによる切断部位を示す。

図4は、MKタンパク質発現ベクターに使用するpPIC9Kの構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター(5' AOX1)、サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha$ 1因子のシグナル配列(S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列(3' AOX1-TT)、および5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、ColE1のものを含み、選択マーカとして、アンピシリン耐性遺伝子(Ampicillin)、ピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(HIS4)、およびカナマイシン耐性遺伝子(Kanamycin)を含む。

図5は、MKタンパク質発現ベクターに使用するpPIC9の構造を示す図である。該ベクターは、ピキア酵母アルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター

(5' AOX1), サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha$ 1因子のシグナル配列(S)、AOX1遺伝子の転写終結のためのDNA配列(3' AOX1-TT)、および5' AOX1と共にピキア酵母染色体DNAへの部位特異的挿入に関与する3' AOX1を含み、シグナル配列直後にマルチクローニング部位を含む。大腸菌での複製開始点として、ColE1のものを含み、選択マーカとして、アンピシリン耐性遺伝子(Ampicillin)、およびピキア酵母ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(HIS4)を含む。

図6は、MKタンパク質発現株pPIC9K-4AhMK/GS115(サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha$ 1因子のシグナル配列を含む)の5mM EDTA存在下、EDTA非存在下におけるファーマンタ培養、およびpHIL4-hMK/GS115(MKタンパク質固有分泌のシグナル配列を含む)のファーマンタ培養、における培養上清中のMKタンパク質の発現量を、ELISA法により測定した結果を示す図である。

図7は同じく、図6の培養上清中のMKタンパク質の発現量を、FPLCで測定した結果を示す図である。

図8は、MKタンパク質発現株pPIC9K-4AhMK/GS115(サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha$ 1因子のシグナル配列を含む)の培養上清中から精製したMKタンパク質のMALDI質量分析結果を示す図である。

図9は、MKタンパク質発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168(サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha$ 1因子のシグナル配列を含む)のファーマンタ培養における培養上清中のMKタンパク質の発現量をFPLCにて測定した結果を示すグラフである。

図10は同じく、真正MKタンパク質発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168(サッカロミセス・セレビスエ由来の $\alpha$ 1因子のシグナル配列を含む)の培養上清中から精製したMKタンパク質の質量分析結果を示す図である。

図11は、発現株pHIL4-hMK/GS115をファーマンタ培養し、その培養上清から精製されたMKタンパク質の質量分析結果を示す図である。

図12は、発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168をファーマンタ培養し、その培養上清から精製されたMKタンパク質のCDスペクトルを示す図である。

図13は、真正MKタンパク質によるNIH3T3細胞の増殖活性を示す図である。

図14は、pPIC9-hPTN/GS115のファームメンタ培養上清のHPLCカラム (PolySULFOETHYL A ; Poly LC社) による溶出プロファイルを示す図である。

図15は、ヒトミットカインの分泌シグナルを使用した発現株pHIL4MK-hPTN/GS115をファームメンタ培養し、培養上清から精製されたヒトプレイオトロフィンの質量分析結果を示す図である。

図16は、発現株pPIC9-hPTN/GS115をファームメンタ培養し、培養上清から精製されたヒトプレイオトロフィンの質量分析結果を示す図である。

図17は、発現株pPIC9-hPTN/GS115をファームメンタ培養し、培養上清から精製されたヒトプレイオトロフィンのCDスペクトルを示す図である。縦軸 (CD値) は、平均残基楕円率 [ $\theta (\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1})$ ] で示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

##### [実施例1] MKタンパク発現ベクターの構築

3種類の分泌シグナル配列を含むヒトMKタンパク発現ベクターを構築した。発現ベクターの構築は、例えばJ.Sambrook, E.F.Fritsch, T.Maniatis ((1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA) により記載されたような標準的な方法に準じて行った。

##### (1) MKタンパク固有の分泌シグナル配列を含む発現ベクター

MKタンパク固有のシグナル配列を含む発現ベクターは、特開平9-95454号公報の実施例1に記載のMKタンパク発現ベクター “pHIL4-hMK” を使用した。

##### (2) PHO1の分泌シグナル配列を含む発現ベクターの構築

PHO1のシグナル配列 (図1) を含む発現ベクターpHILS1 (PHILLIPS PETR-



OLEUM Co.,) (図2)を使用した。該発現ベクターは、アルコール オキシダーゼのプロモーター、PHO1のシグナル配列および該配列中におけるマルチクロニング部位、選択マーカーとしてHIS遺伝子およびアンピシリン耐性遺伝子等を含んでいる。ヒトMKタンパク質をコードするcDNA (配列番号: 1) を鋳型とし、制限酵素EcoRI認識部位を含むセンスPCRプライマー (配列番号: 3) およびアンチセンスPCRプライマー (配列番号: 4) を用いてPCR反応を行い、成熟MKcDNAを増幅した。MKcDNAは、制限酵素EcoRIにより完全消化し、ホスファターゼで脱リン酸された発現ベクターpHILS1のEcoRI部位に挿入し、MKタンパク発現ベクター“pHILS1-3AhMK”を得た。該発現ベクターで大腸菌HB101を形質転換した。形質転換した大腸菌クローンをいくつか選び、これに含まれる発現ベクターを鋳型とし、適当なプライマーを使用してPCRを行い、挿入cDNAの方向が正しいことを確認した。さらに、該発現ベクターについて、MKcDNAおよび挿入部位付近の塩基配列を決定し、塩基配列に誤りのないことを確認した。該発現ベクターpHILS1は、正常にプロセスされたとしても3個の余分なアミノ酸が成熟MKタンパク質のアミノ末端に結合することになる。

### (3) $\alpha 1$ 因子分泌シグナル配列を含む発現ベクターの構築 (その1)

サッカロミセス セレビスエの $\alpha$ フェロモン遺伝子(MF $\alpha 1$ )の分泌因子シグナル配列 (以下、「 $\alpha 1$  因子分泌シグナル配列」という) (図3) を含む発現ベクターpPIC9K (図4) を使用した。該発現ベクターは、上記発現ベクターpHILS1に、さらにG418による多コピー選択用のカナマイシン耐性遺伝子を含んでいる。上記(2)の方法に準じて、MKcDNAを発現ベクターpPIC9Kに挿入し、MKタンパク発現発現ベクター“pPIC9K-4AhMK”を得た。該発現ベクターは、正常にプロセスされたとしても、4個の余分なアミノ酸が結合することになる。

### (4) $\alpha 1$ 因子分泌シグナル配列を含む発現ベクターの構築 (その2)

$\alpha 1$  因子分泌シグナルを含む発現ベクターpPIC9 (図5) を使用した。pPIC9に挿入する成熟MKcDNAは、センスPCRプライマー (配列番号: 5) およびアン

チセンスPCRプライマー（配列番号：4）を用いて（2）と同様にして作製した。

制限酵素EcoRIおよびXhoIにより完全消化されたMK cDNAは、同様に消化され、ホスファターゼで脱リン酸された発現ベクター pPIC9に挿入し、MKタンパク発現ベクター “pPIC9DP-hMK” を得た。

#### [実施例2] MKタンパク質発現ベクターによるピキア酵母の形質転換

ピキア酵母GS115、およびSMD1168へのMKタンパク質発現ベクターの導入は、Invitrogenの電気穿孔法のプロトコール（例えば、pPICZA $\alpha$ , B, C, Version A, 160410, 25-0150）に準じて行った。SMD1168は、プロテアーゼ活性が低いpep4<sup>-</sup>株である。

実施例1で得られた4種類のMKタンパク質発現ベクターpHILD4-hMK、pHILS1-3AhMK、pPIC9K-4AhMK、およびpPIC9DP-hMKは、制限酵素SacIまたはBglIIで完全消化した。初期対数増殖期のGS115、あるいはSMD1168を蒸留水、および1Mソルビトールで洗浄後、1Mソルビトールに懸濁し、発現ベクターを加えた。Bio-RadのGenePulserを用い、1.5kV、25 $\mu$ F、200-400オームの条件で電気穿孔法を行った。形質転換体は、Hisの非要求性でまず選択し、必要であればさらにG418耐性による選択を行った。このようにして、発現ベクターpHILD4-hMK、pHILS1-3AhMK、pPIC9K-4AhMK、あるいはpPIC9DP-hMKで形質転換されたMKタンパク質発現株pHILD4-hMK/GS115、pHILS1-3AhMK/GS115、pPIC9K-4AhMK/GS115、あるいはpPIC9DP-hMK/SMD1168を得た。

#### [実施例3] MKタンパク質発現株の試験管またはフラスコ培養

培地はファーマンタ用完全合成培地を使用し、グリセリンを炭素源として、1日培養した。1度菌体を遠心して沈殿させ、1%メタノールを含んだ新しい培地に懸濁し、MKタンパクの発現を誘導した。1%メタノールは毎日添加し、その際に、pHを5または3に調製した。発現誘導は3日間行った。

##### （1）分泌シグナルによる発現量の違い

発現株pHILD4-hMK/GS115、pHILS1-3AhMK/GS115、あるいはpPIC9K-4AhMK/GS115の試験管培養における培養上清中のMKタンパクの発現量を調べた。pHILS1-3AhMK/GS115の場合、MKタンパク質の発現量は極めて少なく、多いものでも0.1mg/L程度であった。発現株pHILD4-hMK/GS115の場合、発現量の多いものでは2～3mg/Lの分泌が認められた。これに対して、発現株pPIC9K-4AhMK/GS115の場合には、発現量の多いものでは10mg/Lに達した。すなわち、 $\alpha 1$ 因子のシグナル配列を用いると、MKタンパク固有の分泌シグナル配列を用いた場合の3～5倍程度のMKタンパク質の発現量が得られることが明らかである。以上の結果をまとめると次のとおりとなる。

	分泌シグナル	MKファミリー	発現量
pHILD4-hMK	MK	MK	2 - 3 mg/L
pHILS1-3AhMK	PHO1	MK	0.1 mg/L
pPIC9K-4AhMK	$\alpha 1$ 因子	MK	10 mg/L (宿主はGS115)

### (2) 発現時のpHによる発現物の違いについて

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115を用いて、発現時のpHを3および5に調整した発現を行った。培養上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。ゲルプレートは第一化学薬品 (株) のマルチゲル10/20を使用した。発現3日目のMKタンパク質は、2本のバンドとして認められ、pH5では、分子量の小さい下のバンドが主となるが、pH3では分子量の大きい上のバンドが主となっている。これは、pH3では、pH5よりもMKタンパク質の分解が少ないことを示唆している。

### (3) 宿主の種類による発現物の違いについて

発現株pPIC9K-4AhMK/GS115、およびpPIC9DP-hMK/SMD1168におけるMKタンパクの発現を調べた。3日間発現後の培養上清のSDS-PAGEでは、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合には、明らかにMKタンパクが2本に見えるが、pPIC9DP-hMK/SMD1168の場合には、1本に見える。すなわち、プロテアーゼ活性の低い細胞株SMD1168を宿主

とした場合には、MKタンパク質の分解が抑えられていることを示唆している。

#### 〔実施例4〕 MK発現株のファーメンタ培養

発現株pHILD4-hMK/GS115およびpPIC9K-4AhMK/GS115のファーメンタ培養を、J.J.Clareら (BIO/TECHNOLOGY, Vol.9, 455-460, 1991) の方法にしたがって行った。ただし、増殖時のpHを4とし、発現時の培養温度を20°Cとした。発現4日目の培養上清中のMKタンパク質をELISA法 (特開平10-160735記載の方法) で測定した。pHILD4-hMK/GS115の場合、MKタンパク発現量が30~50mg/Lであるのに対して、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合は約200mg/Lであり、さらに、培地にEDTAを加えると発現量が約240mg/Lと増加した (図6)。一方、同じサンプルについて、MKタンパクの発現量を、Hitrap-Heparin (ファルマシア社製, 1mL) カラムを用いたFPLC分析 (0-2M NaCl, 50mM pH7.5 Tris-HCl緩衝液、流速1 mL/min) にて、280nmの吸光度により測定した結果 (標準物質はバブチド研究所製化学合成の成熟MKタンパク質) では、pHILD4-hMK/GS115の場合約50mg/Lであるのに対して、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合約580mg/Lを示し、さらにEDTAを加えた場合は約640mg/L (MKタンパク質1mg/mL=1.8A<sub>280</sub>) を示した (図7)。すなわち、ファーメンタ培養の場合も、試験管培養の場合と同様に、 $\alpha$ 1因子のシグナル配列を用いると、MKタンパク固有の分泌シグナル配列を用いた場合よりも、MKタンパクの発現量が5~8倍程度増加した。また、培養上清中のSDS-PAGEおよびウエスタンブロットによる分析結果から、培養上清中の主たるタンパク質は、分泌発現したヒトMKであることが明らかであった。

#### 〔実施例5〕 精製MKタンパク質の解析 (その1)

pPIC9K-4AhMK/GS115のファーメンタ培養上清から、SP-セファロースおよびヘパリンセファロースを用いてMKタンパクを精製した。

培養上清10mlを取り、等量の蒸留水を加えて希釈した。pHをアンモニアで5に調製し、60mM酢酸緩衝液pH5.2で平衡化した約1mlのファルマシア社のストリームラインSPカラムにアプライし、吸着後、0.5M NaClを加えた緩衝液で洗い、その後

2 M NaClを含んだ緩衝液でMKタンパクを溶出した。溶出物を50mM Tris-HCl (pH7.5)の緩衝液に対して透析した。透析物を上記透析に使用した緩衝液で平衡化したファルマン社のストリームラインヘパリン約0.5mlのカラムにアプライし、0.5M NaClを含んだ上記緩衝液でカラムを洗浄後、2 M NaClを含んだ上記緩衝液でMKタンパクを溶出した。溶出物を蒸留水に対して透析して精製MKタンパク質を得た。

精製MKタンパクの質量分析は、MALDI法により行った。使用した分析器は、PerSeptive BiosystemsのVOYAGER ELITEである。マトリックスとしては、Sinapinic acid (10mg/ml アセトニトリル/水/TFA=33/67/0.1)を用いた。乾燥サンプルを30  $\mu$ lの水に溶解し、マトリックス溶液を9倍量加えた溶液を1  $\mu$ lサンプルプレートにアプライし使用した。キャリブレーションは、Ubiquitin(+1):8565.89(average)とMyoglobin(+1):16952.56(average)を標準タンパク質として行った。

アミノ末端アミノ酸配列の分析は、エドマン法により行った。使用したプロテインシーケンサーは、島津製作所のPPSQ21である。

精製MKの質量分析では、予想MKタンパク質（成熟MKタンパク質のN末端にTyr-Val-Glu-Pheが付加したもの）の他に、該タンパクのN末端から、Tyr-Val-Glu-Phe-Lysの5アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lysの7アミノ酸が除かれたもの、Tyr-Val-Glu-Phe-Lys-Lys-Lys-Asp-Lys-Val-Lys-Lysの12アミノ酸が除かれたものが観察された（図8）。また、発現MKタンパクのN末端分析の結果、Tyr、Lys、Aspが検出され、これらは予想発現物MKタンパク質、アミノ末端から上記5アミノ酸が除かれたもの、および7アミノ酸が除かれたもののアミノ末端のアミノ酸と一致する。そして、糖の結合したMKの明らかなシグナルは観察されない。これらの結果から、発現MKタンパク質は、糖の結合をとまっていないことが明らかである。

すなわち、 $\alpha$ 1因子のシグナル配列を使用すると、MK固有のシグナル配列を使用する場合と比較して、MKタンパク質の発現量が著明に増大すること、そし

て発現産物への酵母特異的な糖の付加が非常に少ないことが明らかである。

〔実施例 6〕 精製 MK タンパク質の解析（その 2）

実施例 2 で得られた発現株 pPIC9DP-hMK/SMD1168 をファーメンタ培養した。基本的には実施例 4 に記載の方法にしたがったが、グリセリンによる細胞増殖を  $A_{600} = 100$  程度までにし、その後メタノール添加を開始し、細胞増殖と発現誘導を同時に行った。発現時の温度は  $20^{\circ}\text{C}$ 、pH は 3 に設定した。発現誘導は 9 日間行った。FPLC によって MK タンパクの発現量を測定した結果、培養 8 日目に最大  $360\text{mg/L}$  であった（図 9）。7 日目の培養上清  $10\text{ml}$  から MK タンパク質を、実施例 5 と同様に、SP-セファロース、およびヘパリンセファロースを使用して精製した。また、別に、Hitrap-Heparin（ファルマシア社製、 $1\text{mL}$ ）カラムを用いた FPLC [50mM Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液中、0-2M NaCl 濃度勾配による溶出] による精製も行った。

発現 MK タンパクと、標準物質である化学合成の成熟 MK タンパク質（ペプチド研究所）について、還元 SDS-PAGE、非還元 SDS-PAGE、および Native-PAGE を行って比較したが、分子量などの違いは認められなかった。なお Native-PAGE は、Davis の方法に従って行ったが、目的タンパク質の等電点が高いため、泳動槽の電極の結合を逆にした。アミノ末端のアミノ酸配列は、表 1 に示すように、成熟 MK タンパクのアミノ末端のアミノ酸配列に一致した。

表 1

発現産物のN末端アミノ酸配列の解析結果

分析サイクル	アミノ酸の種類	アミノ酸量 (pmol)
1	Lys	114
2	Lys	119
3	Lys	132
4	Asp	109
5	Lys	125
6	Val	137
7	Lys	123
8	Lys	121
9	Gly	94
10	Gly	94

また、試料を100  $\mu$ Lの純水に溶解し、この内の50  $\mu$ Lをガラス試験管に採取し、50  $\mu$ Lの濃塩酸を添加し、真空封管下、110°Cで22時間加水分解反応を行った。試料を乾固し、再び、75  $\mu$ Lの純水に溶解し、その内50  $\mu$ Lを日立アミノ酸分析計 L8500 を用いたアミノ酸分析法によりMKのアミノ酸組成を分析した。結果を表 2 に示す。

表 2

発現産物 (MK) のアミノ酸組成分析結果

Amino acid	Expected	bMK(Std) (ペプチド研)	rhMK (pPIC9DPbMK/SMD1168)
Asx	8	7.68	7.70
Thr	10	9.51	9.59
Ser	3	2.81	2.78
Glx	11	11.22	11.37
Gly	16	16.00	16.00
Ala	10	9.96	10.03
Val	5	4.88	4.89
Cys	10	n. d.	n. d.
Met	0	0.00	0.00
Ile	2	1.85	1.93
Leu	1	0.98	1.01
Tyr	2	1.93	1.73
Phe	3	2.93	2.97
Lys	23	22.81	22.62
His	0	0.00	0.00
Arg	7	6.73	6.80
Trp	4	n. d.	n. d.
Pro	6	6.11	5.89

塩酸の加水分解を行っているために測定できないTrpや正確な数値が得にくいCysを除いて、理論値、および標準物質である化学合成の成熟MKタンパク質（パブリド研究所）の値と比較して良い一致を示し、純度よくMKが得られたことを示している。

質量分析の結果は、予想値の分子量とほぼ同じ13241.2(+1の値、理論値+1は13241.3)であり（図10）、宿主をGS115からSMD1168に変更するとともに培養条件を変えると、pPIC9K-4AhMK/GS115の場合と比較して、分解物の量はごく僅かとなった。そして、糖の結合したMKによるシグナルも認められなかった。比較のために、MK自身のシグナル配列を含む発現株（pHILD4-hMK/GS115）を培養し、発現されたMKを精製して質量分析した結果を図11に示す。真正MKのピークは最も高い（測定値13241.6）が、糖が一個から18個結合していると考えられるMKのピークが観察される。真正MKより質量数の少ないものは部分的に分解されたMKと考えられる。真正MKはある割合でしか得られず、また、糖の結合のみが異なる分子種が多数含まれるため、真正MKの精製も困難である。以上のことから、ここで得られたMKタンパク質は、糖の結合がない真正な成熟MKタンパク質が大部分をしめる。また、発現量も今まで使用していた株に比べると格段に多い。したがって、この発現株pPIC9DP-hMK/SMD1168をMKタンパク質の分泌生産に使用すれば、真正MKタンパク質を大量分泌発現させることが可能である。

また、ここで得られた真正MKタンパク質の2次構造に関する情報を得るためにCDスペクトルを測定した結果を図12に示す。

#### 〔実施例7〕 生物活性測定

##### （1）NIH3T3線維芽細胞の増殖活性

Swissマウス胎児由来の株化線維芽細胞NIH3T3に対する細胞増殖促進活性を検討した。96-Well細胞培養プレートにウェルあたり、2000個のNIH3T3細胞を播種し、10%仔ウシ血清（FCS）を添加したDulbecco's modified Eagle medium（DMEM）



で24時間培養した。この培地に真正MKを0~5000ng/mL (BSAを標準タンパク質としたBCA法に基づくタンパク質濃度) 添加したDMEM/Ham's F-12 1:1混合培地+ITS (10mg/L human insulin, 10mg/L human transferrin, 10 $\mu$ g/L selenous acid) に全量交換し、さらに2日間培養した。その後、培地にWST-1試薬を添加し、4時間後の各ウェルの吸光度をプレートリーダーにより計測し、生細胞数を測定した。その結果、生細胞数は用量依存的に増加することが明らかとなった (図13)。

#### [実施例8] P T Nタンパク発現ベクターの構築

実施例1に準じて、 $\alpha$ 1因子分泌シグナル配列を含むヒトP T Nタンパク発現ベクター“pPIC9-hPTN”を構築した。ヒト成熟P T Nタンパク質をコードするcDNAは、P T N cDNA (配列番号: 6) を鋳型とし、制限酵素EcoRI認識部位を含むセンスP C Rプライマー (配列番号: 8)、およびアンチセンスP C Rプライマー (配列番号: 9) を用いてP C R反応で増幅した。

#### [実施例9] P T Nタンパク質発現ベクターによるビキア酵母の形質転換

実施例2に準じて、pPIC9-hPTNを、ビキア酵母GS115に導入し、P T Nタンパク発現株pPIC9-hPTN/GS115を得た。

#### [実施例10] P T Nタンパク質の発現

pPIC9-hPTN/GS115を、実施例4の方法に準じて、ファーマンタ培養し、その培養上清50mlをHPLCカラム (PolySULFOETHYL A; Poly LC社) で分離した。溶出は、0.7 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-35 mM MPB (リン酸緩衝液pH2.7) で行った。結果を図14に示す。

保持時間30分までは核酸などの低分子物質、140~162分は、糖付加P T Nと考えられ、179分のピークが真正P T Nタンパク質とみなされる。ピーク面積より、真正P T Nタンパクの発現量は約250mg/Lである (P T Nタンパク質1mg/mL=1.56A<sub>280</sub>)。

#### [実施例11] P T Nの精製

(1) S P精製ーストリームライン S P (アマシャムファルマシア社) 5 $\times$ 100cm カラムに300mlの担体を加え、上方流により流動床を作製した。20mM

酢酸緩衝液、pH 5.5にて平衡化した後、4.9 Lの培養液を水にて2倍希釈後アプライした。同緩衝液で上方流により洗浄後、下方流にて担体を固定化し、洗浄した。2 M塩化ナトリウム-20 mM酢酸緩衝液、pH 5.5で溶出し、200 mlの溶出画分を得た。

(2) 硫酸エステル精製-硫酸化セルロファインm (生化学工業社)

500 mlの担体をカラムに充填し、0.4 M塩化ナトリウム-10 mMリン酸緩衝液、pH 7.2にて平衡化した。SP精製溶出液200 mlを水にて3倍希釈し、最終濃度10 mMとなるようにリン酸緩衝液を加えた。8規定水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整後、アプライした。0.7 M塩化ナトリウム-10 mMリン酸緩衝液、pH 7.2にて洗浄後、2 M塩化ナトリウム-10 mMリン酸緩衝液、pH 7.2で溶出し、195 mlの溶出画分を得た。

(3) ゲルろ過精製-スーパーデックス75 pg (アマシャムファルマシア社)

1.3 × 60 cmカラムを2本直列接続し、0.152 M塩化ナトリウムで平衡化した。硫酸エステル溶出画分195 mlをアプライし、同液で溶出し、200 mlの溶出画分を得た。

(4) イオン交換精製-ポリスルフォエチルA (polyLC社)

1 × 25 cmカラムを0.6 M塩化ナトリウム-20 mM酢酸緩衝液、pH 5.5で平衡化後、ゲルろ過溶出液50 mlをアプライし、0.88 M塩化ナトリウム-20 mM酢酸緩衝液、pH 5.5にて洗浄した。同液溶出直前に2 M塩化ナトリウム-20 mM、pH 5.5に切り換え、濃縮溶出画分20 mlを得た。同工程を4回行った。精製の結果を表に示す。

表 3

組み換えヒトブレイオトロフィン(rhPTN)の精製<sup>1</sup>

	Volume(ml)	rhPTN(mg) <sup>2</sup>	Purity(%) <sup>3</sup>	Yield(%)
Expanded bed	200	950	63	96
Sulfateed Cellulofine	195	840	70	85
Gel filtration	200	828	74	84
PolvSULFOETHYL A	80	713	90	72

1 ビキア酵母培養液 4.9L から精製した結果である。

2 HPLCにより定量した。

3 HPLCにより分析した際の、280nmにおける吸光度の割合で示した。

[実施例 11] 精製PTNタンパク質の解析

・アミノ末端解析

精製PTNのアミノ末端のアミノ酸配列は表4に示すように真正PTNタンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列に一致した。

表 4

発現産物 (PTN) のN末端アミノ酸配列の解析結果

分析サイクル	アミノ酸の種類	アミノ酸量 (pmol)
1	Gly	95
2	Lys	111
3	Lys	111
4	Glu	96
5	Lys	112
6	Pro	75
7	Glu	58
8	Lys	74
9	Lys	86
10	Val	67

・アミノ酸組成

精製PTNのアミノ酸組成は、表5に示す様に、期待される値と実験値とはほぼ同じであった。この場合には、酸加水分解によるシステインの分解はほとんど見られ

なかった。

表 5

発現産物 (P T N) のアミノ酸組成分析結果

Amino acid	Expected	rhPTN (pPIC9-hPTN/GS115)
Asx	7	6.40
Thr	12	11.25
Ser	6	5.37
Glx	20	19.79
Gly	12	11.74
Ala	7	6.83
Val	4	3.89
Cys	10	9.67
Met	2	1.85
Ile	2	1.89
Leu	7	6.78
Tyr	1	0.97
Phe	2	1.95
Lys	28	28.21
Trp	4	-
His	1	1.08
Arg	5	4.63
Pro	6	5.90

#### ・質量分析

ヒトミッドカインの分泌シグナルを使用して発現させ、精製されたプレイオトロフィンのMALDI法による質量分析の結果を図 1 5 に示す。このときには真正プレイオトロフィン、15305(+1)、の他にアミノ末端のグリシンが除かれたプレイオトロフィン、15247.8(+1)、や、それぞれの糖の結合したプレイオトロフィンが多量に観察される (例えば15410.9(+1)や15468.3(+1))。これに対して図 1 6 に示す様に、発現株pPIC9-hPTN/GS115により発現されたプレイオトロフィンは、真正プレイオトロフィンの理論値15303.8(+1)とほぼ同じ15302.9(+1)が主たるピークである。15510.5(+1)は、マトリックス分子の結合したものを示す。従って、この発現株pPIC9-hPTN/GS115はPTN蛋白質の分泌生産への使用に適していると考えられる。

#### ・CDスペクトル

精製PTN(6.1mg/mL)を生理食塩水で、0.203mg/mLの濃度になるように希釈し、

JASCO J-500Aを用いたCDスペクトル分析を行った(温度：室温(約24°C)、波長範囲：200～250nm、セル長：1mm、積算回数：8回)。図17に示す様に215nm付近に負のコットン効果が見られ $\beta$ 構造の存在が示唆され、ヒトミッドカインとの構造の類似性が明らかである。二次構造解析(Y. H. Chen, et al., Biochemistry, 11, 4120-4131(1972))、を行ったところ、 $\alpha$ ヘリックス： $\beta$ シート：不規則構造の割合は、それぞれ1:41:58となった。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって真正MKファミリータンパク質を遺伝子組み換え技術によって低コストで、しかも容易に製造することができる。本発明による真正MKファミリータンパク質は、酵母に由来する糖の付加を伴わないので、ヒトのような哺乳動物への投与にあたって抗原性の問題を生じることが無い。したがって本発明の真正MKファミリータンパク質は、医薬品原料として有用である。加えて、本発明による真正MKファミリータンパク質は、期待された生物学的な活性を保持しており、医薬品原料として、あるいはMKファミリーの構造や機能解析のための研究材料として、高い品質を備えているとすることができる。

## 請求の範囲

1. サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来の  $\alpha 1$  因子のシグナル配列に成熟MKファミリータンパク質をコードする遺伝子を連結したことを特徴とする、メチロトロフィック酵母による真正MKファミリータンパク質の分泌発現用ベクター。
2. 下記の要素(a)から(g)で構成されることを特徴とする、請求項1に記載のベクター。
  - (a)ピキア・パストリア (Pichia pastoris) 由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1)プロモーター配列、
  - (b)サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来の  $\alpha 1$  因子のシグナル配列、
  - (c)(b)に連結された成熟MKファミリータンパク質をコードする遺伝子、
  - (d)ピキア・パストリス由来のメタノール誘導性のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1)の転写終結配列、
  - (e)大腸菌及びメチロトロフィック酵母 (methylophilic yeast)で機能する選択マーカー遺伝子、
  - (f)大腸菌で機能する複製開始点、及び
  - (g)メチロトロフィック酵母染色体 DNA への部位特異的相同組換えのための 5' AOX1 及び 3' AOX1
3. MKファミリータンパク質が、MKタンパク質である請求項1に記載のベクター。
4. MKファミリータンパク質がPTNタンパク質である請求項1に記載のベクター。
5. 請求項1～4のいずれかに記載のベクターで形質転換したメチロトロフィック酵母からなる形質転換体。
6. ベクターが請求項3に記載のベクターであり、メチロトロフィック酵母が

SMD1168 である、請求項 5 に記載の形質転換体 pPIC9DP-hMK/SMD1168。

7. ベクターが請求項 4 に記載のベクターであり、メチロトロフィック酵母が GS115 である、請求項 5 に記載の形質転換体 pPIC9-hPTN/GS115。
8. 請求項 5 ～ 7 のいずれかに記載の形質転換体を培養し、分泌発現産物を回収する工程を含む、真正 MK ファミリータンパク質の製造方法。
9. 次の工程を含む、請求項 8 に記載の真正 MK ファミリータンパク質の製造方法。
  - (a) 請求項 6 に記載の形質転換体を培養する工程
  - (b) pH4 で増殖後に 20°C、pH3 の条件下で MK タンパク質の発現を誘導する工程
  - (c) 分泌発現産物を回収する工程





1 / 17

図 1

```

<----- 5'AOX1-----><-      PHO1シグナル配列      -----
.....TTATTGGAACG/ATG TTC TCT CCA ATT TTG TCC TTG GAA ATT ATT TTA GCT

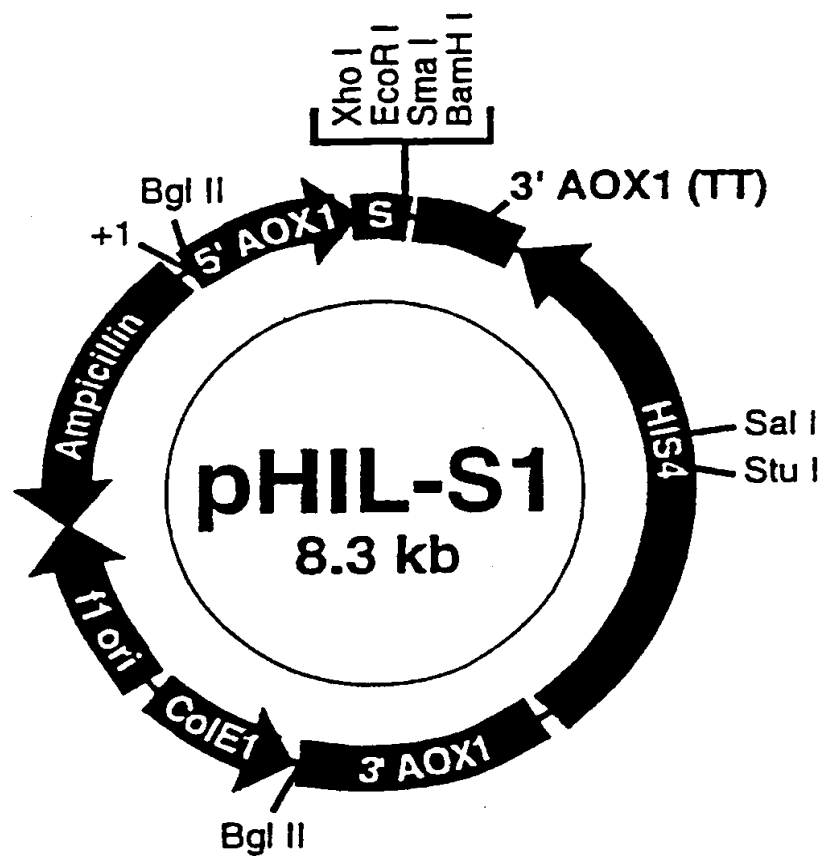
TTG GCT ACT TTG CAA TCT GTC TTC GCTVCGA GAA TTC CCC GGG ATC CTT AGA CAT
--      PHO1シグナル配列      ----->V<--      マルチクローニングサイト -----><-3'AOX1-

```



2 / 17

图 2





3 / 17

3

```

.....5'AOX1...TTCGAAGGATCCAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val
(1)
TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCTIGCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA
Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Arg Ile Thr Thr Glu Asp Glu
ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT
Asp Val Ala Val Leu Leu Pro Phe Ser Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Phe Ile Asn
(2)
ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGAAGAG
Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg Glu

```

```

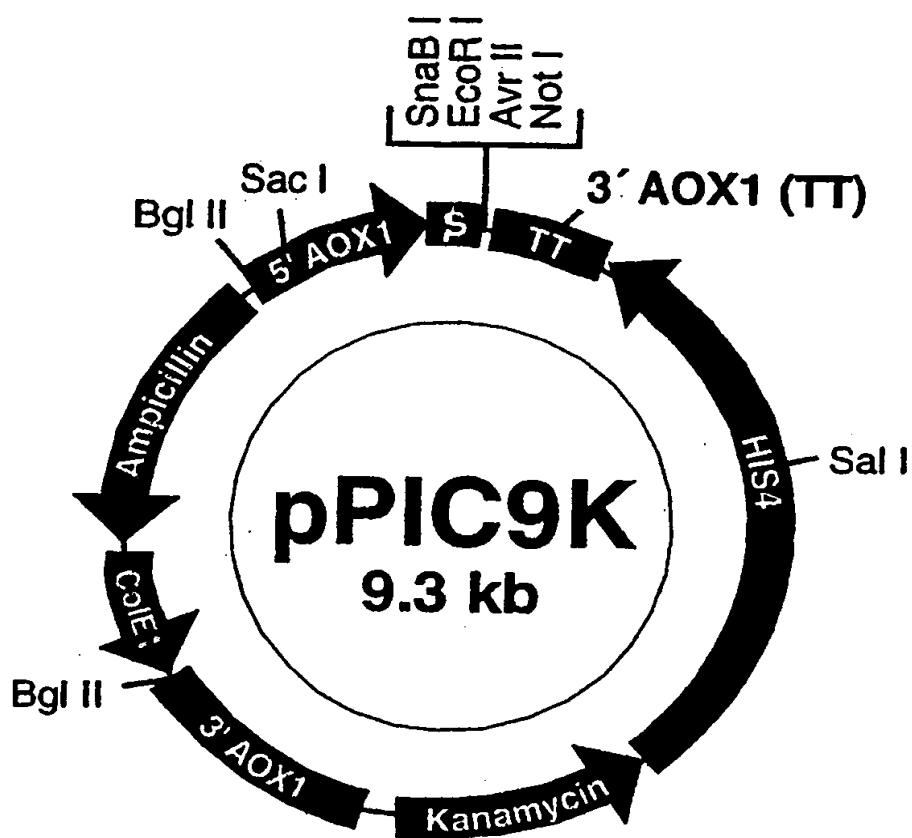
(3) Hind III
      Sna BI Eco RI Avr II Not I
      GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG ...
      Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala

```



4 / 17

☒ 4

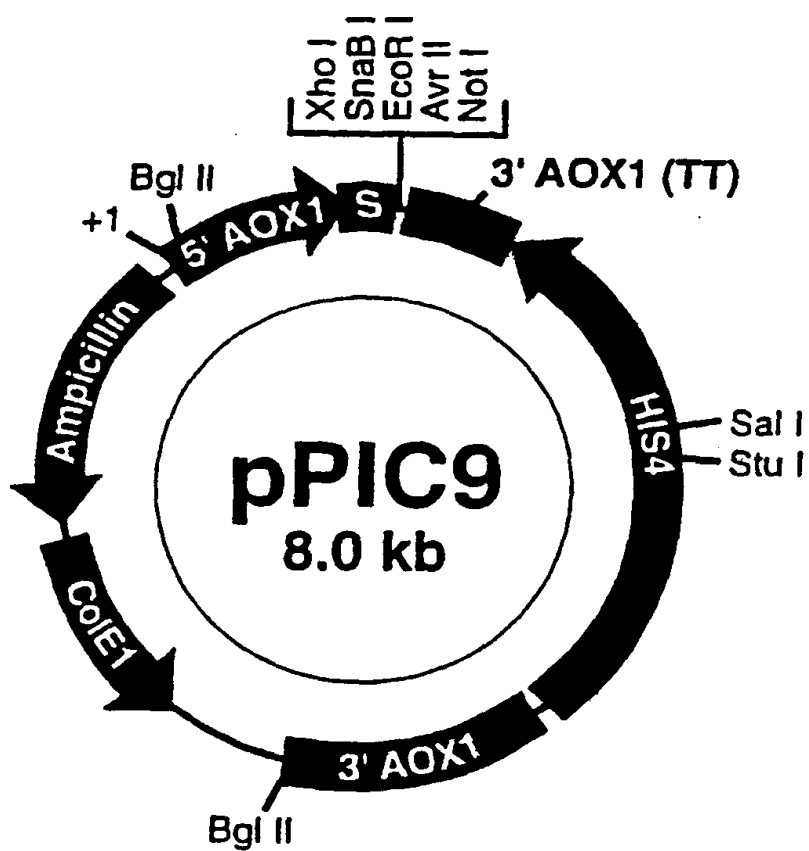






5 / 17

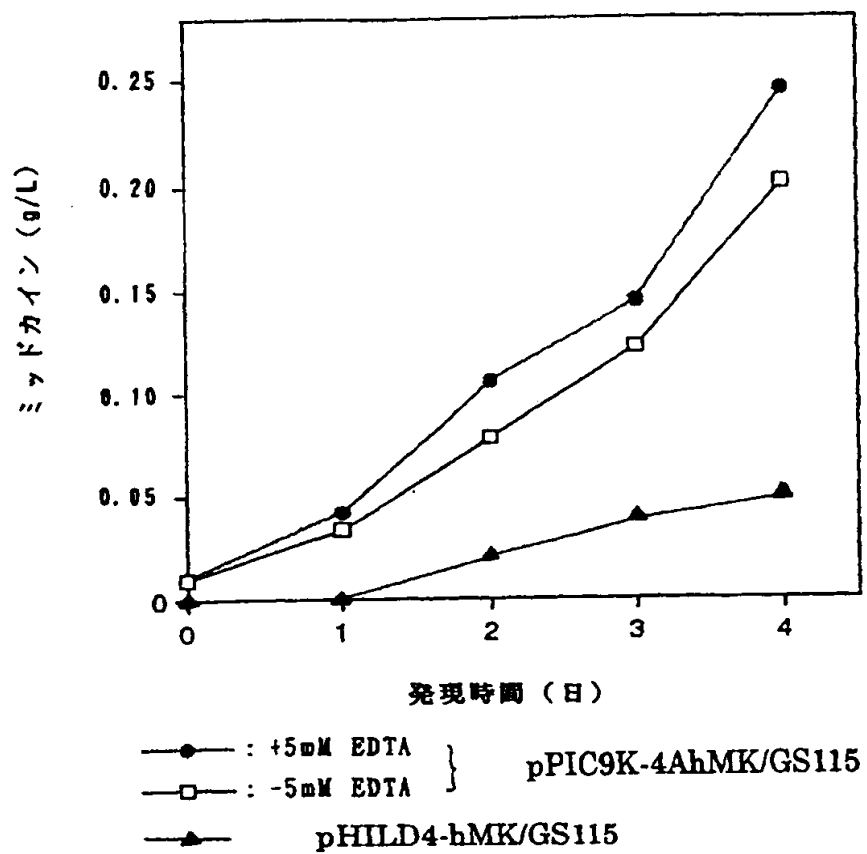
図 5





6 / 17

図 6





7 / 17

図 7

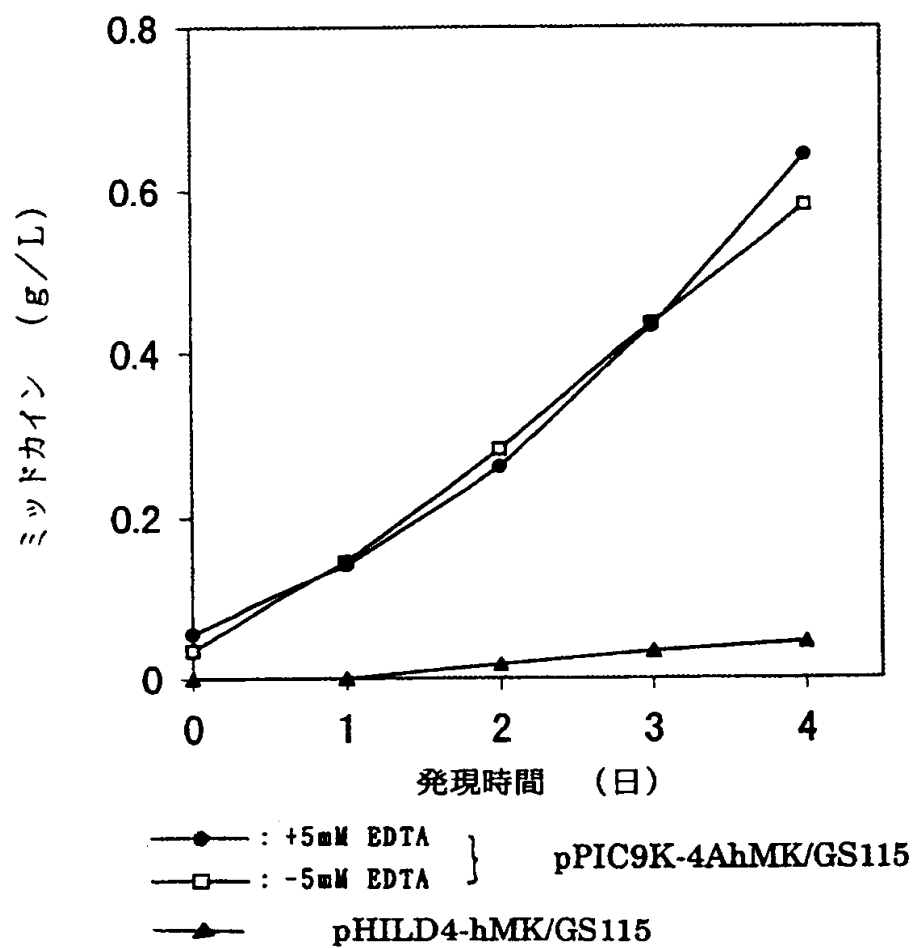
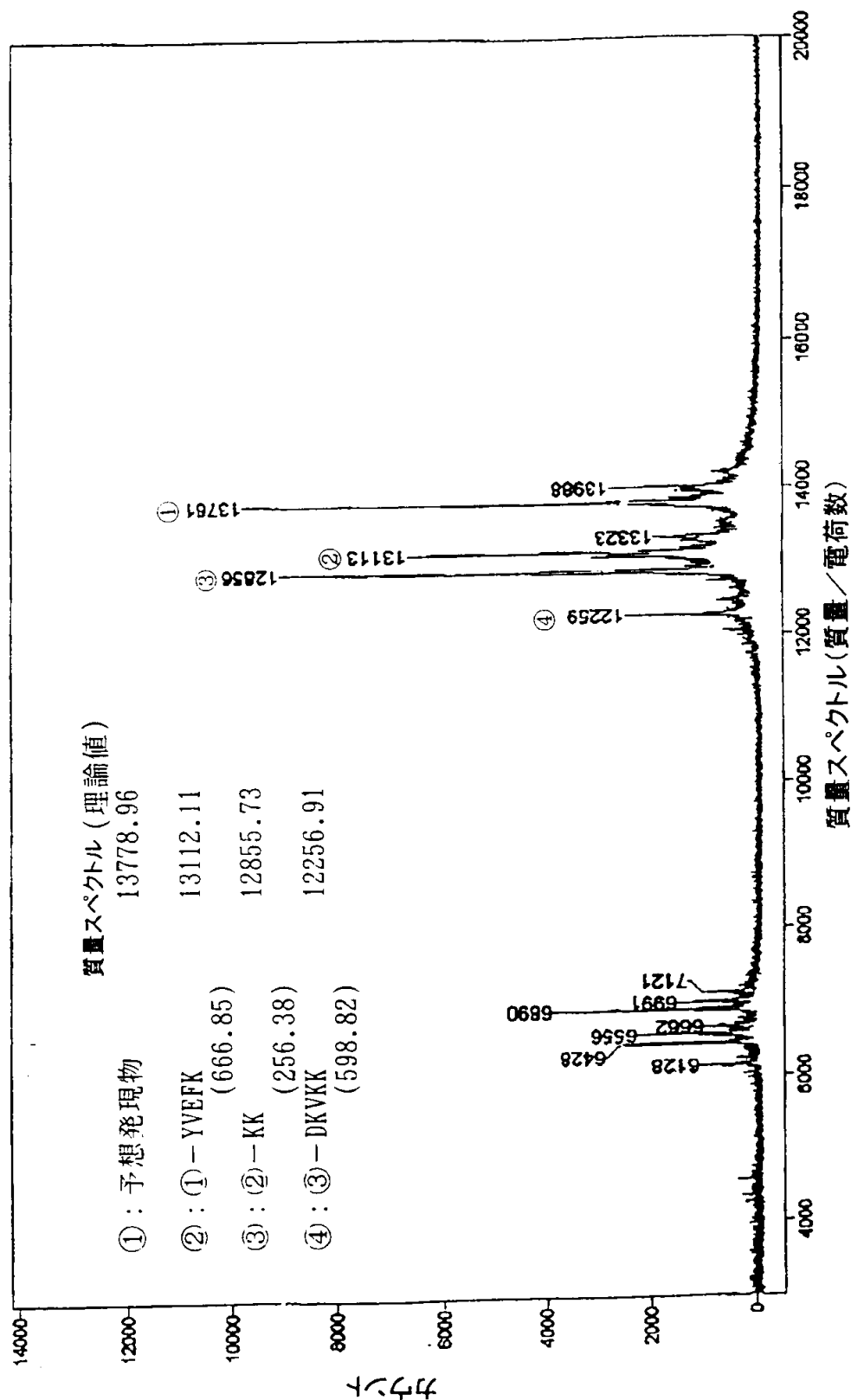




図 8





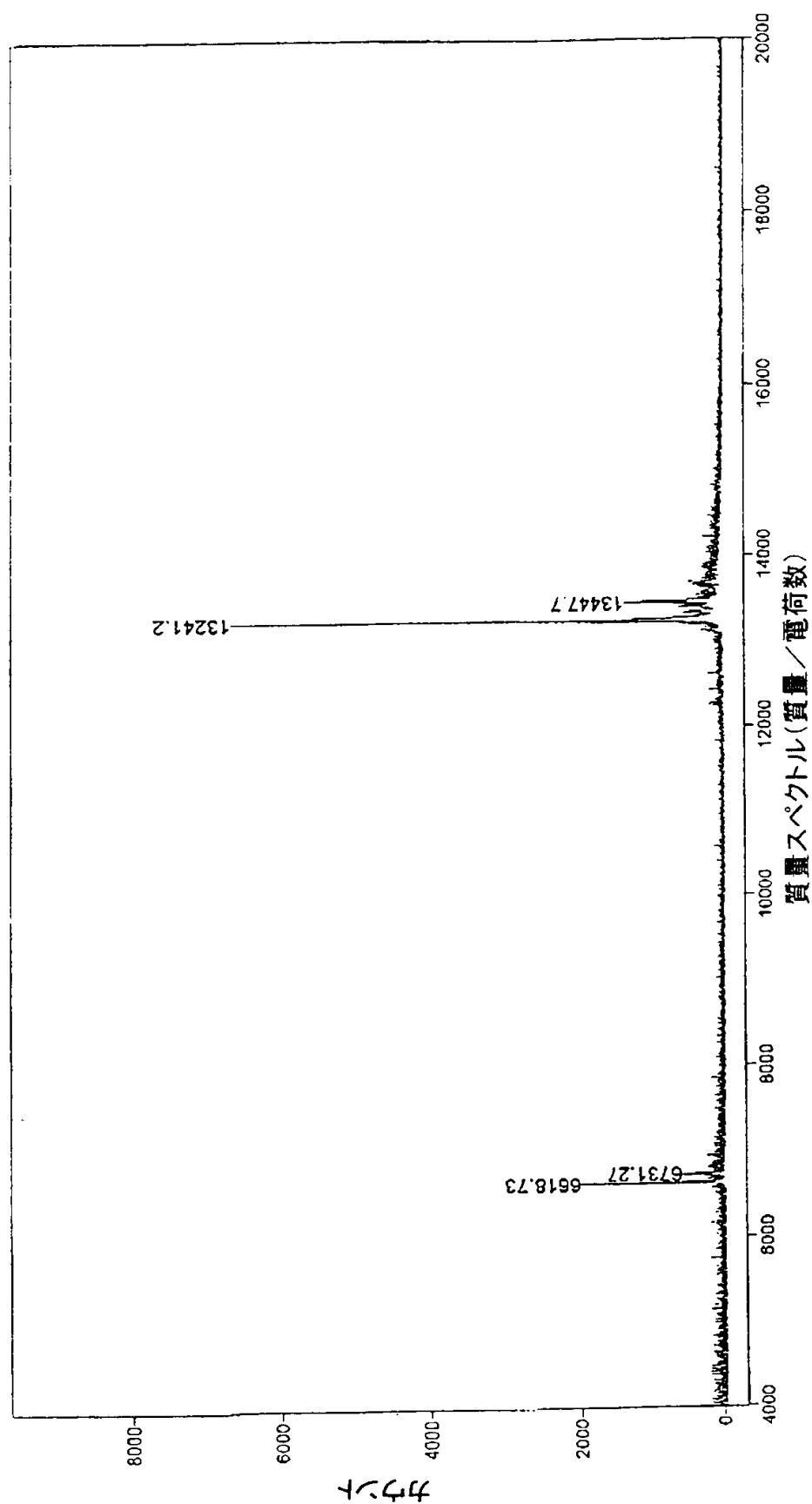






10 / 17

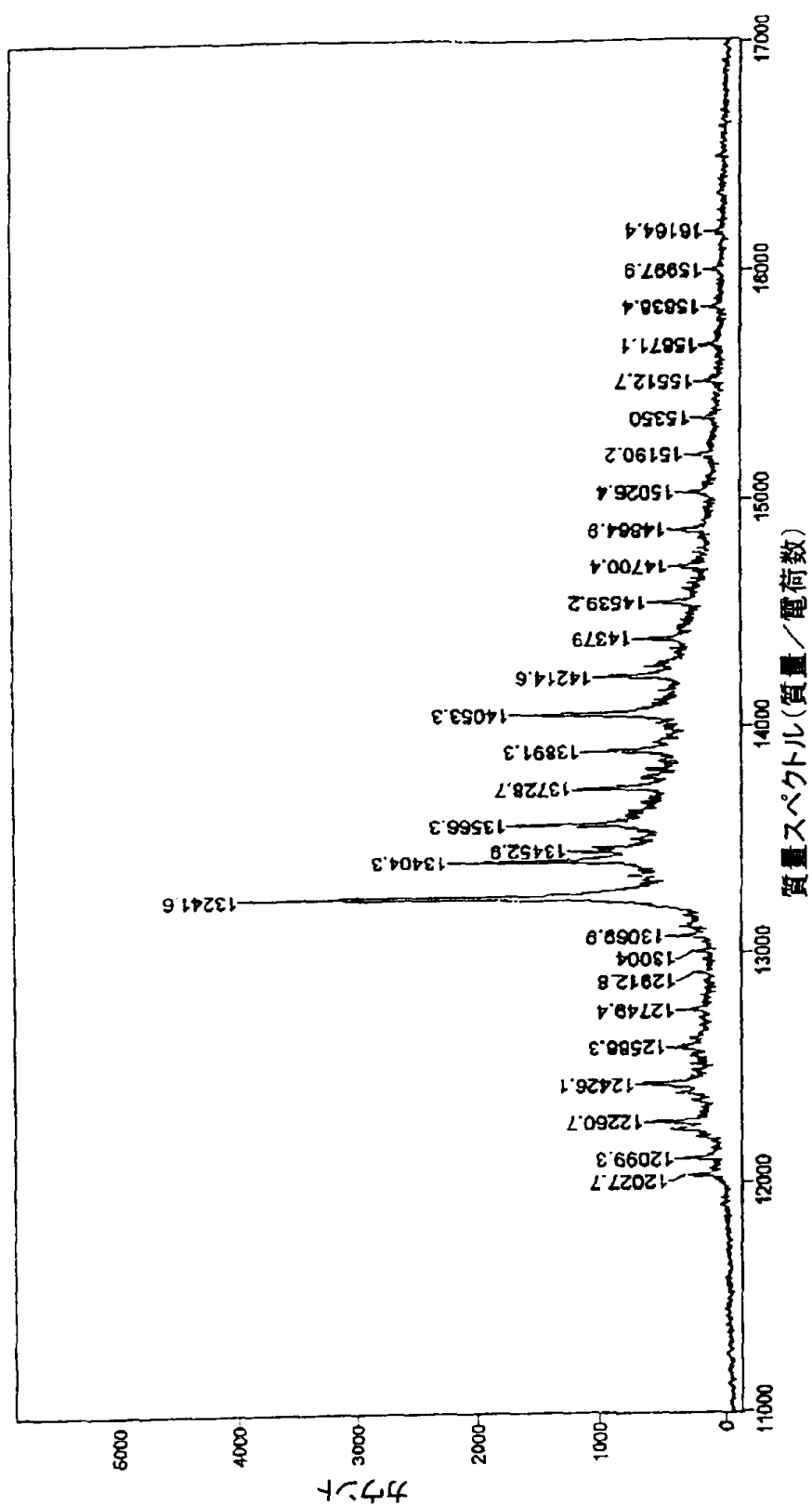
図 10





11 / 17

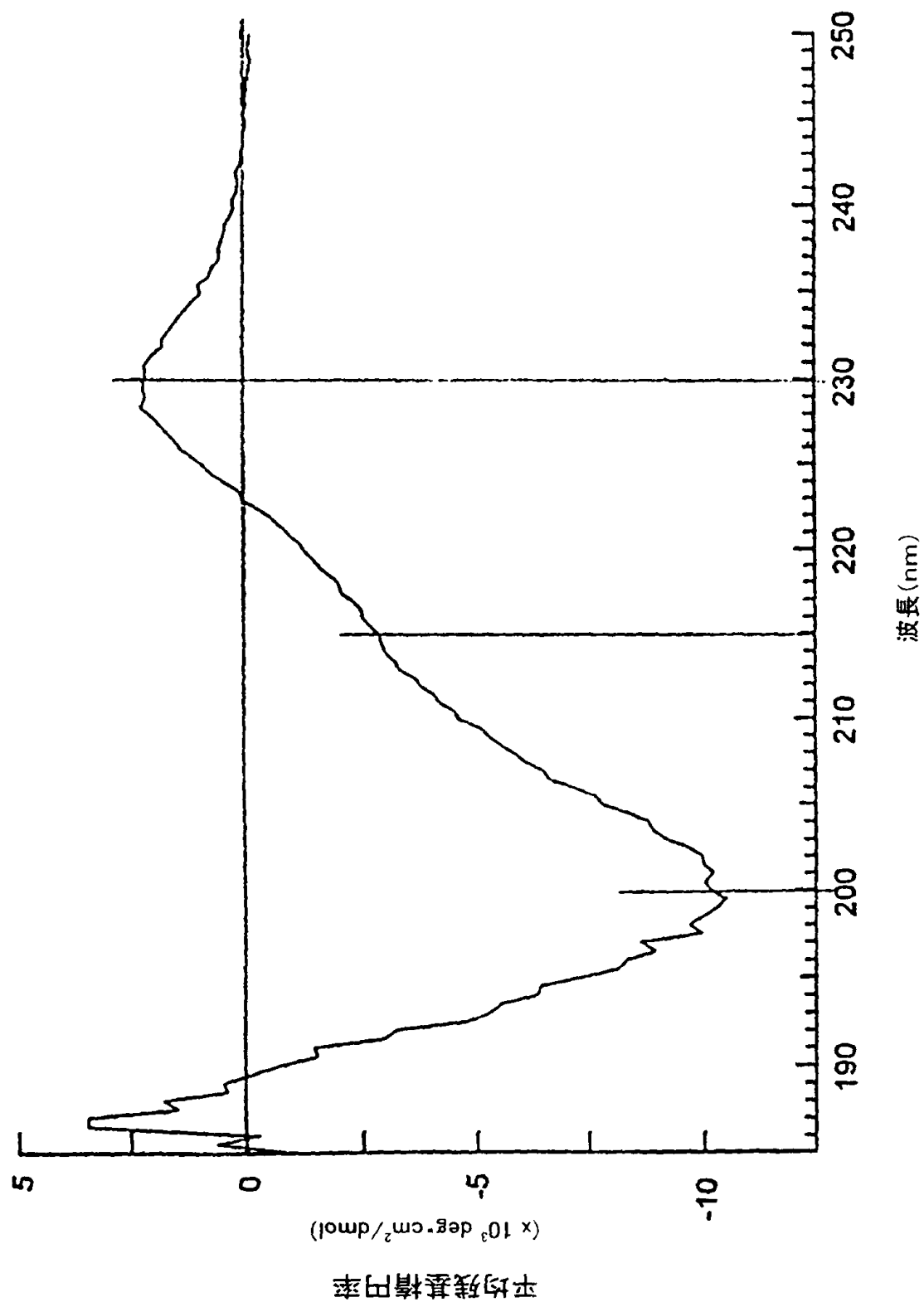
111





12 / 17

図 12

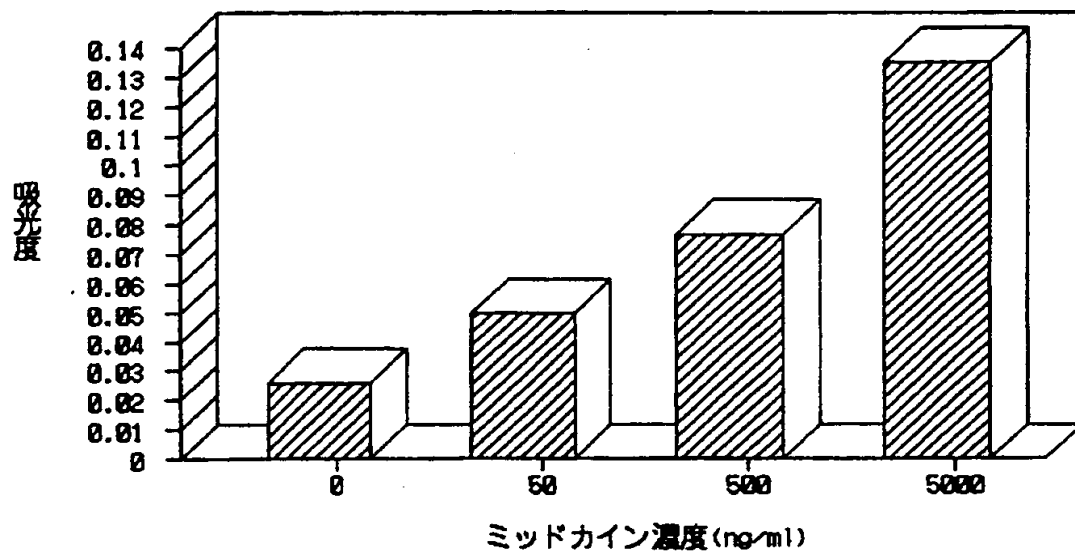






13/17

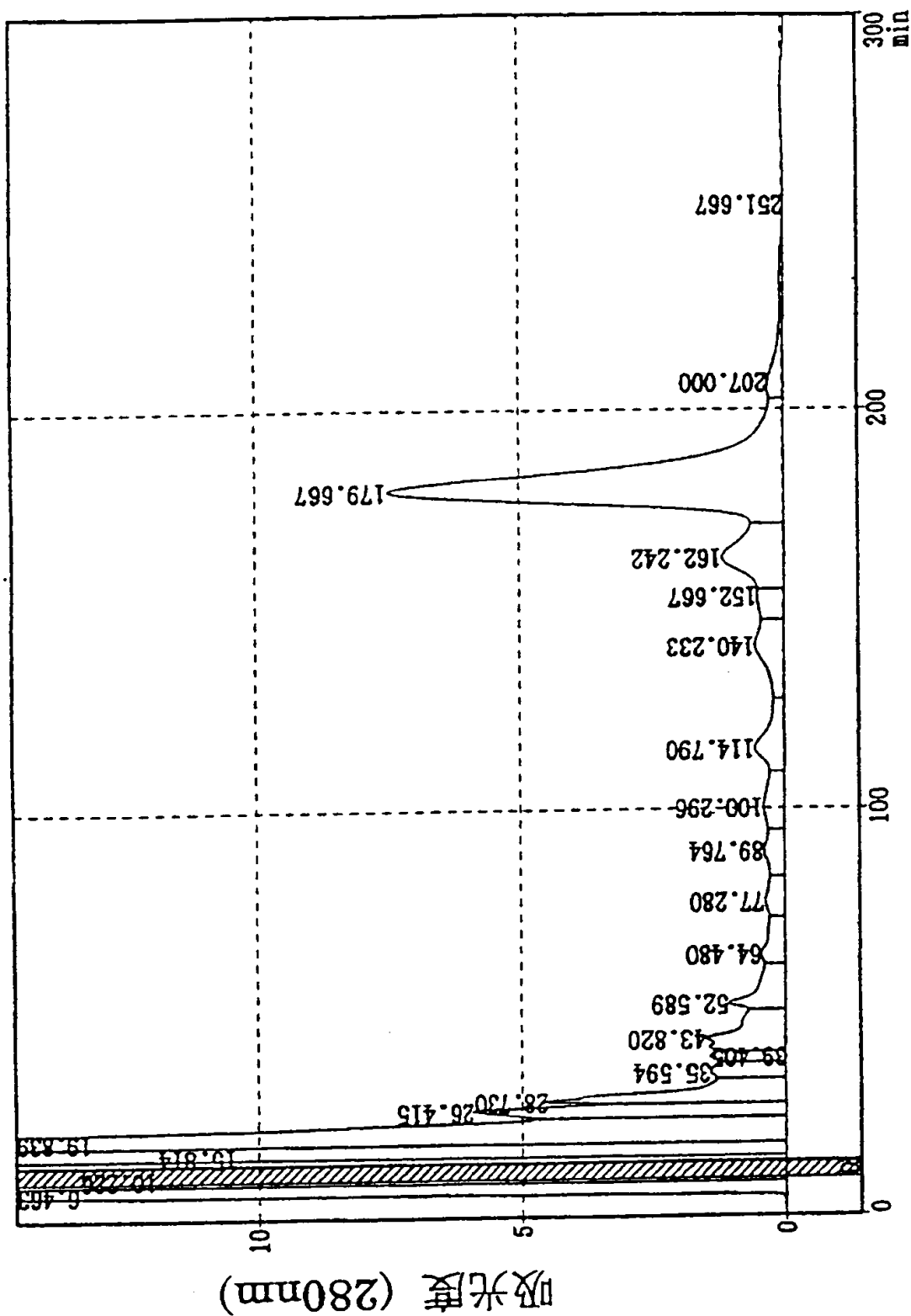
図13





14 / 17

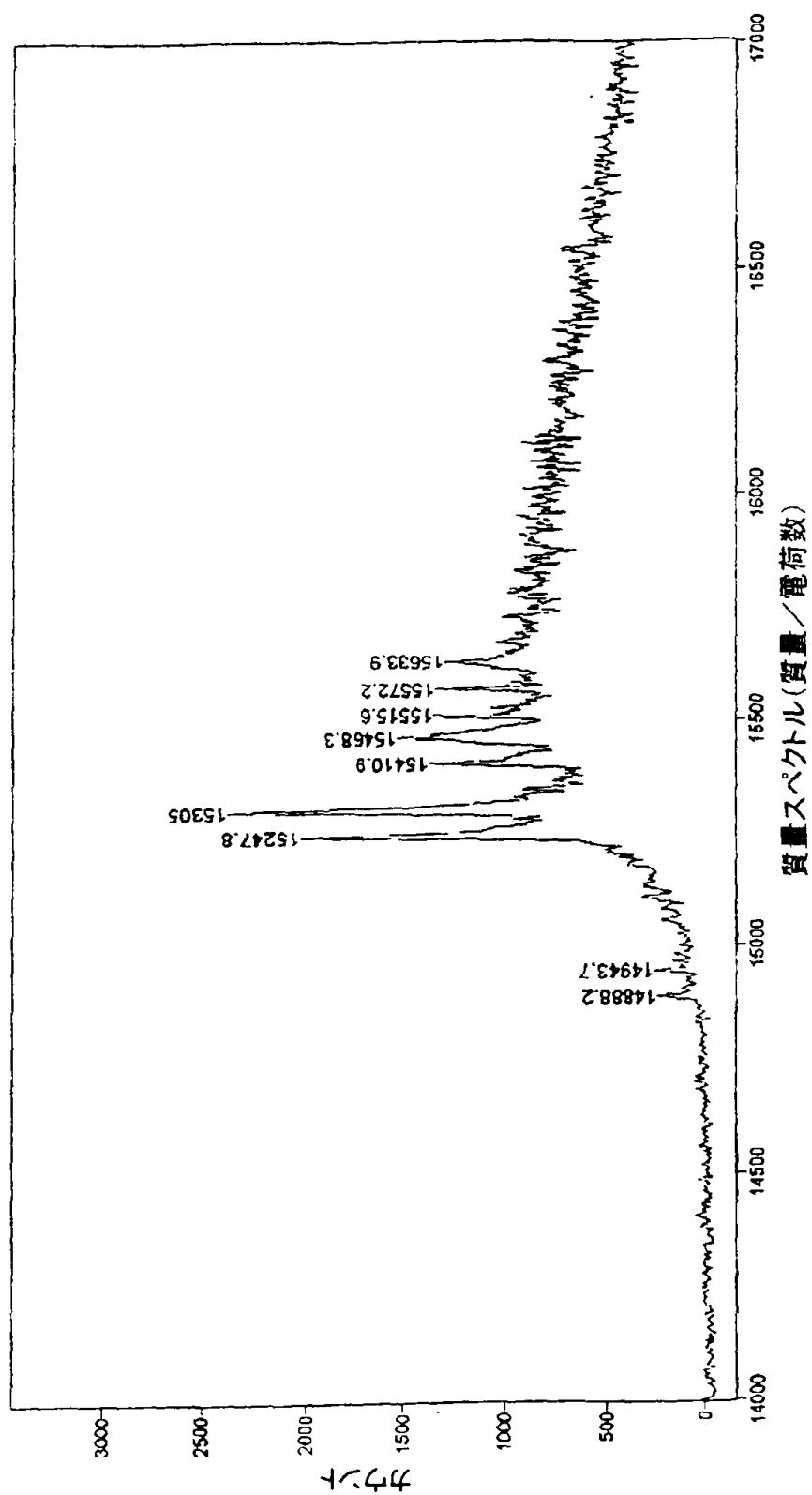
図 14





15 / 17

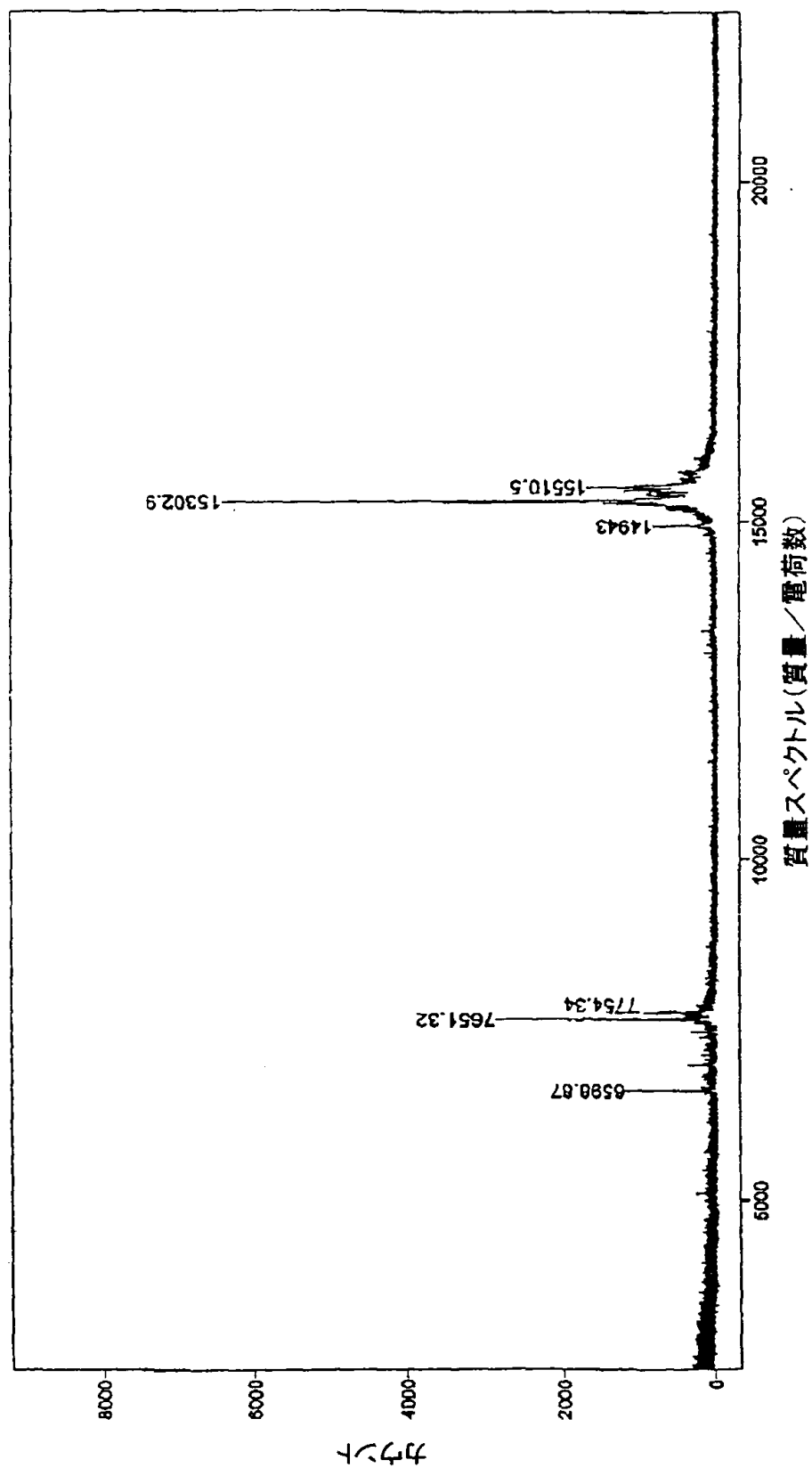
図 15





16 / 17

図 16

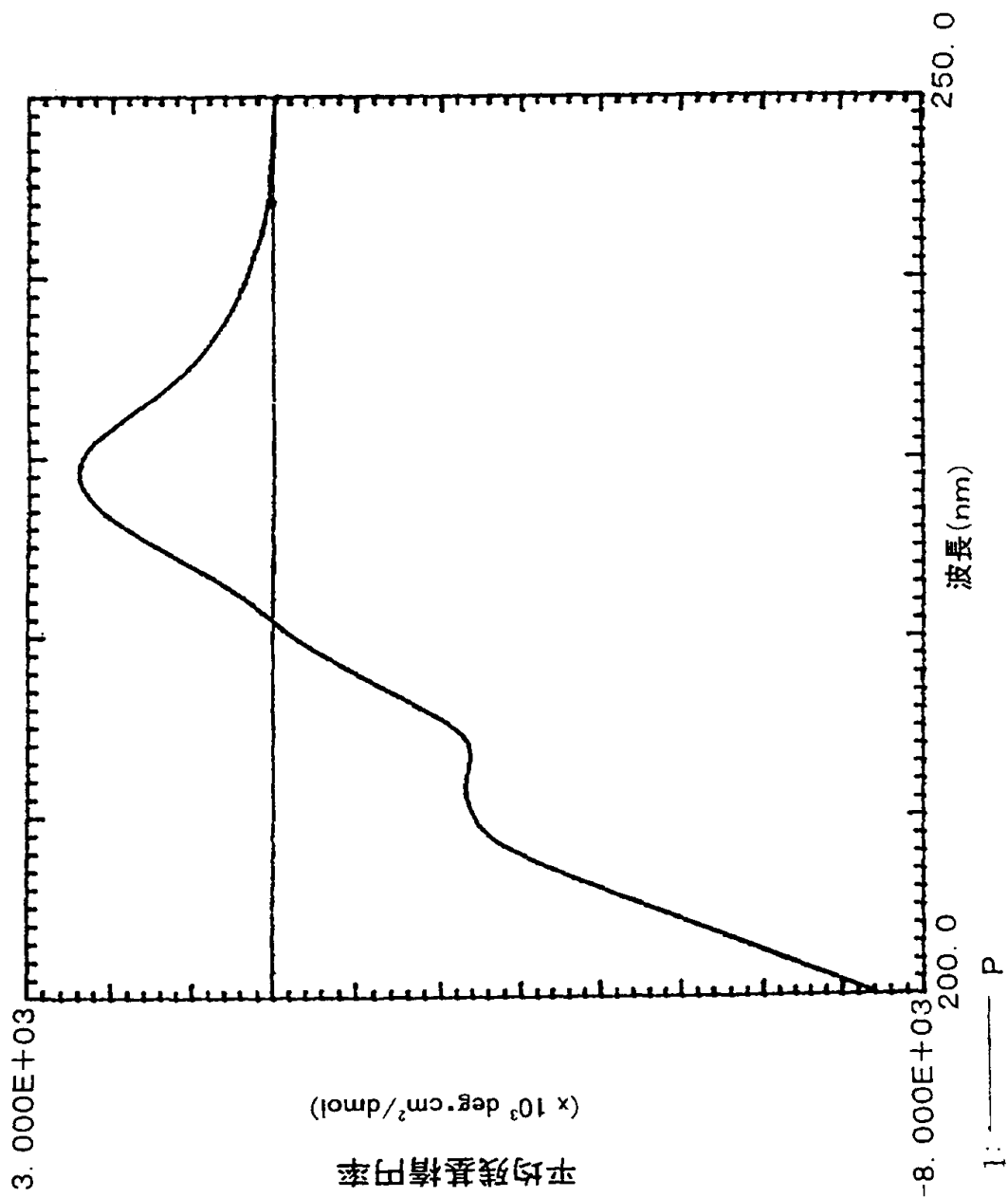






17 / 17

図 17





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Milk Products Co., LTD

明治乳業株式会社

<120> High level Secrete Expression system for Midkine family proteins using methylotrophic yeast as host.

メチロトロフィック酵母を宿主としたMKファミリータンパク質の大量分泌発現系

<130> M1-104PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-236621

<151> 1998-08-10

<150> JP 1998-84583

<151> 1999-03-26

<160> 9

<170> Patent In Ver.2.0



2/7

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 562

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

```

atgcagcacc gaggettcct cctcctcacc ctctcgccc tgctggcgt cacctccgcg   60
gtcgccaaaa agaaagataa ggtgaagaag ggcggcccg ggagcgagt cgctgagtgg  120
gcctgggggc cctgcacccc cagcagcaag gattcgcgcg tgggtttccg cgagggcacc  180
tgcgggggccc agaccagcg catccggtgc agggtgccct gcaactggaa gaaggagttt  240
ggagccgact gcaagtacaa gtttgagaac tggggtgcgt gtgatggggg cacaggcacc  300
aaagtccgcc aaggcaccct gaagaaggcg cgctacaatg ctcagtgcc ggagaccatc  360
cgcgtcacca agcctgcac cccaagacc aaagcaaagg ccaaagcaa gaaaggaag  420
ggaaaggact agacccaag cctggatgcc aaggagcccc tgggtgcaca tggggcctgg  480
cccagccct cctctccca ggcccgagat gtgaccacc agtgccttct gtctgctcgt  540
tagctttaat caatcatgcc cc                                     562

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 143

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

```

Met Gln His Arg Gly Phe Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala
  1               5               10              15
Leu Thr Ser Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Gly
                20               25              30
Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Ala Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser
                35               40              45

```



3/7

Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln

50

55

60

Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe

65

70

75

80

Gly Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly Ala Cys Asp Gly

85

90

95

Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Tyr

100

105

110

Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro Cys Thr Pro

115

120

125

Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly Lys Asp

130

135

140

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

gcgcccgaat tcaaaaagaa agataaggtg aagaaggcg gcccgggg 48

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4





4/7

gcgcccgaat tcttagtcct ttccttccc tttcttggt ttggcc 46

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

gcgcccctcg agaaaagaga ggctgaagct aaaaagaaag ataagtgaa gaaggcggc 60

<210> 6

<211> 507

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

atgcaggctc aacagtacca gcagcagcgt cgaaaatttg cagctgcctt cttggcattc 60

attttcatac tggcagctgt ggatactgct gaagcagga agaaagagaa accagaaaaa 120

aaagtgaaga agtctgactg tggagaatgg cagtggagtg tgtgtgtgcc caccagtgga 180

gactgtgggc tgggcacacg ggagggcact cggactggag ctgagtgcaa gcaaaccatg 240



5/7

aagaccaga gatgtaagat ccctgcaac tggaagaagc aatttggcgc ggagtgcaaa 300

taccagttec aggctgggg agaattgtgac ctgaacacag ccctgaagac cagaactgga 360

agtctgaagc gagecctgca caatgccgaa tgccagaaga ctgtcaccat ctccaagccc 420

tgtggcaaac tgaccaagcc caaacctcaa gcagaatcta agaagaagaa aaaggaaggc 480

aagaaacagg agaagatgct ggattaa 507

<210> 7

<211> 168

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Gln Ala Gln Gln Tyr Gln Gln Gln Arg Arg Lys Phe Ala Ala Ala

1 5 10 15

Phe Leu Ala Phe Ile Phe Ile Leu Ala Ala Val Asp Thr Ala Glu Ala

20 25 30

Gly Lys Lys Glu Lys Pro Glu Lys Lys Val Lys Lys Ser Asp Cys Gly

35 40 45



6/7

Glu Trp Gln Trp Ser Val Cys Val Pro Thr Ser Gly Asp Cys Gly Leu  
50 55 60

Gly Thr Arg Glu Gly Thr Arg Thr Gly Ala Glu Cys Lys Gln Thr Met  
65 70 75 80

Lys Thr Gln Arg Cys Lys Ile Pro Cys Asn Trp Lys Lys Gln Phe Gly  
85 90 95

Ala Glu Cys Lys Tyr Gln Phe Gln Ala Trp Gly Glu Cys Asp Leu Asn  
100 105 110

Thr Ala Leu Lys Thr Arg Thr Gly Ser Leu Lys Arg Ala Leu His Asn  
115 120 125

Ala Glu Cys Gln Lys Thr Val Thr Ile Ser Lys Pro Cys Gly Lys Leu  
130 135 140

Thr Lys Pro Lys Pro Gln Ala Glu Ser Lys Lys Lys Lys Lys Glu Gly  
145 150 155 160

Lys Lys Gln Glu Lys Met Leu Asp  
165

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA



<213> Human

<400> 8

gcgcccctcg agaaaagagg gaagaaagag aaaccagaaa aaaaagtg

48

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

gcgccogaat tcttaatcca gcattttctc ctgtttcttg cc

42





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04332

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>6</sup> C12N 15/81, C12N 1/19, C12P 21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>6</sup> C12N 15/81, C12N 1/19, C12P 21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hishimura Fumio "Secretory production of heterogeneous proteins by yeasts", Chemistry and Biology (1983), Vol.26, No. 9(no.298), p.568-618	1-9
A	JP, 2-156881, A (Agency of Industrial Science & Technology), 15 June, 1990 (15.06.90) (Family: none)	1-9
A	JP, 2-156880, A (Agency of Industrial Science & Technology), 15 June, 1990 (15.06.90) (Family: none)	1-9
A	Par Gellerforst et al. "Isolation and characterization of a glycosylated form of human insulin-like growth factor I produced in Saccharomyces cerevisiae", The Journal of Biological Chemistry (1989), Vol.264, No. 19, p.11444-11449	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
12 November, 1999 (12.11.99)Date of mailing of the international search report  
24 November, 1999 (24.11.99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C 12 N 15/81, C 12 N 1/19, C 12 P 21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C 12 N 15/81, C 12 N 1/19, C 12 P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	菱沼 文男 “酵母による異種蛋白質の分泌生産”, 化学と生物 (1983), Vol. 26, No. 9 (298号) p. 568-618	1-9
A	JP, 2-156881, A (工業技術院長) 15.6月.1990 (15.06.90) ファミリーなし	1-9
A	JP, 2-156880, A (工業技術院長) 15.6月.1990 (15.06.90) ファミリーなし	1-9

☒ ①欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小森 道明

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の サマリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Par Gellerforst et al. "Isolation and characterization of a glycosylated form of human insulin-like growth factor I produced in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", The Journal of Biological Chemistry (1989), Vol. 264, No. 19 p. 11444-11449	1-9

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条、  
PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 04 DEC 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 M1-104 PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04332	国際出願日 (日、月、年) 10.08.99	優先日 (日、月、年) 10.08.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl. C12N15/81, C12N1/19, C12P21/02		
出願人(氏名又は名称) 明治乳業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.02.00	国際予備審査報告を作成した日 22.11.00		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 小暮 道明 印	4 B	9358
電話番号 03-3581-1101 内線		3488	

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)



## 1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された（法第6条（PCT 14条）の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17）

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項 出願時に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ 図、 出願時に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ 図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ 図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ 出願時に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則31(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならないが、本報告に添付する。）





V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT 35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1 - 9

有

請求の範囲

無

進歩性 (IS)

請求の範囲 1 - 9

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲 1 - 9

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明 (PCT 規則70.7)

文献1: 化学と生物 (1983) Vol. 26 No. 9 (298号) p. 568-618

文献2: JP, 2-156881, A (工場技術院長) 15.06月.1990 (15.06.90)

文献3: JP, 2-156880, A (工場技術院長) 15.06月.1990 (15.06.90)

文献4: The Journal of Biological Chemistry (1989)

Vol. 264 No. 19 p. 11444-11449

請求の範囲 1 ~ 9 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 1 ~ 4 に対して進歩性を有する。文献 1 ~ 4 より、 $\alpha$  1 因子の signal 配列を用いた酵母の発現系、並びに、アルコールオキシターゼの promoter を用いたメタノール酸化性菌の発現系は本願優先日前に公知であった。しかし、酵母に由来する糖の付加を伴わないという本願発明の効果は当業者といえども予測できないものである。

